
学位論文

ケモカインレセプター CXCR4 を標的とした口腔癌に対する リンパ節転移抑制療法の開発

富塚 佳史

キーワード: CXCR4, リンパ節転移, 口腔扁平上皮癌, AMD3100, ベスナリノン

Development of Inhibition Therapy for the Lymph Node Metastasis, Targeting a Chemokine Receptor CXCR4, Against Oral Cancer

Yoshifumi TOMIZUKA

Abstract : We have been investigating the correlation between the expression of a chemokine receptor CXCR4 and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma (SCC). In these previous studies, we clarified as follows; First, oral SCC cells, B88 and HNT, which have lymph node metastatic potentials in the orthotopic inoculation model into the masseter muscle of nude mice, express CXCR4. Second, overexpression of CXCR4 in non-metastatic oral SCC cells, IH, which does not express CXCR4, confers them with lymph node metastatic potential. These results suggest that the association between the expression of CXCR4 in oral SCC cells and stromal cell-derived factor (SDF)-1 produced by lymphatic stromal cells is critical for the lymph node metastasis of oral SCC. Thus, in the present study, I investigated the possibility of anti-CXCR4 targeting therapy against lymph node metastasis in oral SCC. In order to assess the possibility of this targeting therapy, 2 knock-down cell lines (siCXCR4-16, siCXCR4-17) were established by introduction of a vector that expressed short hairpin small interfering RNA (siRNA) against CXCR4 into B88 cells. Both cell lines exhibited a reduced expression of CXCR4 both in mRNA and in protein levels, and showed impaired migration in response to SDF-1. Moreover, when siCXCR4-17 cells and control cells were orthotopically inoculated into the masseter muscle of nude mice, lymph node metastasis in siCXCR4-17 cells were significantly inhibited in comparison with control cells. Thus, several agents against CXCR4 was experimentally tested for the inhibition of lymph node metastasis. First, I examined the effect of AMD3100, a CXCR4 antagonist, on the lymph node metastasis of B88 cells. SDF-1-induced migration of B88 cells was significantly inhibited by the treatment of AMD3100 in vitro. When cells were orthotopically inoculated into the masseter muscle of nude mice, administration of AMD3100 significantly inhibited the lymph node metastasis of B88 cells, but did not affect the growth of primary tumors. Second, I tested the effect of kinase inhibitors against phosphatidylinositol 3 kinase or mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase, which are involved both in the signal transduction of CXCR4 and in diverse growth signaling of the cells. Both inhibitors inhibited the cell migration induced by SDF-1 in vitro and lymph node metastasis of the cells in the orthotopic inoculation of nude mice; however, severe body weight loss in the nude mice was observed. Third, I examined the transcriptional

regulation of CXCR4 by conventional chemotherapeutic agents in oral SCC cells. Consequently, vesnarinone, a newly identified chemotherapeutic agent, transcriptionally downregulated CXCR4. Vesnarinone inhibited the cell migration induced by SDF-1 and lymph node metastasis of cells in the orthotopic inoculation model. By using several deletion constructs against CXCR4 promoters, the minimal vesnarinone-responsive element in the CXCR4 promoter region at -300 to -167 relative to the transcription start site was identified. Moreover, using a cDNA microarray method, I identified a transcription factor, krüppel-like factor 2 (KLF2), as a novel vesnarinone-responsive molecule which was able to bind to this region. The forced expression of KLF2 downregulated CXCR4 mRNA and impaired cell migration induced by SDF-1. When KLF2 was knocked down by siRNA against KLF2, CXCR4 mRNA was markedly upregulated. These results suggested that CXCR4 might be a possible molecular target for anti-metastatic therapy against lymph node metastases in cases of CXCR4-related oral SCC.

緒 言

口腔癌は、全世界における発生率が全癌の中で約2.65%と累計されているが¹⁾、咽頭・喉頭を含めた頭頸部癌としては、全癌の中で第6位にランクされる比較的発生頻度の高い悪性新生物である²⁾。そのほとんどの病理組織型は扁平上皮癌であり、その治療法は、放射線療法、手術療法、化学療法に大別され、これらの治療法はこの数年間で目覚ましい進歩を遂げた。すなわち、放射線療法では、従来のγ線から高エネルギーX線照射や粒子線などが臨床応用されるようになり、高エネルギーでピンポイント照射が可能となった。手術療法では、顎顔面再建術の進歩により有茎皮弁から血管柄付遊離皮弁での再建が行われるようになり、切除範囲の拡大が可能となった。化学療法では、バイオケミカルモデュレーションの進歩により、従来口腔扁平上皮癌に注射剤として頻用されていた5-フルオロウラシル(以下5-FUと略)から、テガフル・ウラシル製剤であるUFT³⁾や、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム製剤であるTS-1⁴⁾などの経口剤が開発され、優れた制癌作用と副作用の軽減が可能となった。しかしながら1990年と2000年における口腔癌の治療成績を(致死率/発生率×100)により算出すると、1990年で46.5%⁵⁾、2000年で47.9%⁶⁾と、治療法の進歩にも関わらず、治療成績はこの10年間でほとんど向上していない。この理由として、口腔扁平上皮癌の特徴である高い局所浸潤能と高頻度に生じる所属リンパ節転移が挙げられる。すなわち、高い局所浸潤能は、手術療法時の過小な安全域による術後の局所再発を招き、高頻度に発生する所属リンパ節転移は、遠隔転移の足場となるだけでなく、節外浸潤による切除不能を引き起こす。とりわけリンパ節転移の有無に関しては、生命予後との相関を論ずる数多くの報告が存在することから⁷⁻¹⁰⁾、口腔扁平上皮癌患者の生命予後向上には、リンパ節転移機構の解明と、リンパ節転移を標的とした新規治療法の開発が重要であると考えられる。以上の観点に立ち、我々の研究室では、口腔扁平上皮癌のリンパ節転移機構につき検索してきた。その中で、癌細胞をヌー

ドマウス咬筋内に移植する同所性移植モデルを構築し、従来の背部皮下移植モデルではリンパ節転移能を有しないが、このモデルにてリンパ節転移能を有する口腔扁平上皮癌細胞株 HNT 細胞および B88 細胞を樹立した^{11,13)}。

一方リンパ球ホーミングとは骨髓にて産生された幼若リンパ球が、リンパ節・脾臓などの二次リンパ組織に着床・教育・成熟化される生体システムである^{12,13)}。現在、このシステムは、サイトカインファミリーの一種であるケモカインと呼ばれる低分子量G蛋白と、7回膜貫通構造を有するG蛋白結合型受容体であるケモカインレセプターにより制御されることが明らかにされている^{12,14)}。従来我々の研究室では、口腔癌において頻発するリンパ節転移が、リンパ球ホーミングに類似していると考え、ケモカインシステムによる口腔癌のリンパ節転移機構を研究してきた。その中で、1) 上述の HNT, B88 細胞がケモカインレセプター CXCR4 を特異的に発現していること¹⁴⁾、2) CXCR4 低発現株でリンパ節転移能を有しない IH 細胞に CXCR4 を過剰発現させるとリンパ節転移能を獲得すること¹⁵⁾、3) 初回治療前の口腔扁平上皮癌患者の原発巣における CXCR4 の発現がリンパ節転移・浸潤度・再発率と相関していることを報告してきた¹⁶⁾。これらの現象は、口腔扁平上皮癌細胞における CXCR4 の発現が、リンパ節転移に関与していることを強く示唆するものであり、CXCR4 を標的にしたリンパ節転移抑制療法の可能性が示唆される。そこで本研究では、我々の研究室で確立されたリンパ節転移モデルである、ヌードマウス同所性移植モデルと CXCR4 高発現株である B88 細胞を用い、様々な CXCR4 阻害法を試みることににより、CXCR4 を標的としたリンパ節転移抑制療法の開発を目指すことを目的とした。

材料ならびに方法

1) 細胞および培養方法

当研究室で分離、樹立された舌扁平上皮癌患者由来で、CXCR4 高発現株である B88 細胞¹⁴⁾、舌扁平上皮癌患者由来で、CXCR4 低発現株である IH 細胞と IH 細胞

の CXCR4 強制発現株である IH-CXCR4 細胞¹⁵⁾, あるいはアフリカミドリザル腎臓由来細胞である COS-7 細胞 (ATCC, Manassas, VA, USA より購入) を実験に使用した。これらの細胞は 10% (容量/容量, 以下 V/V と略) の牛胎児血清 (以下 FCS と略, Equitech-Bio Inc., Kerrille, TX, USA), 100 µg/ml ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml ペニシリン (Invitrogen), 0.25 µg/ml アンホテリシン B (Invitrogen) を含むダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (以下 DMEM と略, Sigma, St. Louis, MO, USA) を増殖培養液として用い, 空气中に 5% の割合で炭酸ガスを含む培養器内で 37℃ にて培養を行った。

2) 各種発現ベクターの特徴と構築法

a) RNA 干渉 (以下 RNAi と略) とは, Andrew Z. Fire と Craig C. Mello により線虫の研究ではじめて報告された, 細胞に導入された二本鎖 RNA (siRNA) が, 相同性を有する配列を持つ標的遺伝子の mRNA を破壊することで, 発現 (蛋白質合成) を抑制する現象のことである¹⁷⁾。RNAi 作用を有する CXCR4 small interfering RNA (以下 siRNA と略) 発現ベクターである pSUPER-siCXCR4 は, ミシガン大学歯学部 Taichman S. Russell 博士より供与された¹⁸⁾。本ベクターは CXCR4 特異的なセンス・アンチセンス RNA と, 2 塩基の突出末端を有し, また neo カセットを有することから, 細胞にトランスフェクション後, 安定発現株を樹立することか可能である。本ベクターは核内で発現後, ヘアピン形成を伴う short hairpin RNA (以下 shRNA と略) を形成し, 2 本鎖 RNA に特異的な RNase であるダイサーのプロセッシングを受け, siRNA を生成する。siRNA は RNA-induced silencing complex (以下 RISC と略) と呼ばれる siRNA-蛋白複合体を形成し, CXCR4 mRNA に結合後, CXCR4 の発現を特異的に阻害する。

b) pGL2-CXCR4 (-2632/+86) および pGL2-CXCR4 (-832/+86) の CXCR4 ルシフェラーゼレポーターコンストラクトは, Peter Staller 博士と Wilhelm Krek 博士 (Friedrich-Miescher Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland) より供与された¹⁹⁾。その他のコンストラクトは pGL2-CXCR4 (-832/+86) を以下の制限酵素で切断後, 末端を T4 DNA ポリメラーゼ (宝酒造, 草津) にて平滑化し, T4 DNA リガーゼ (宝酒造) にてセルフライゲーションすることにより作製した。すなわち, pGL2-CXCR4 (-300/+86) は *KpnI* と *MluI* で, pGL2-CXCR4 (-29/+86) は *KpnI* と *SacII* にて切断した。pGL2-CXCR4 (-167/+86) と pGL2-CXCR4 (-72/+86) は, pGL2-CXCR4 (-832/+86) をテンプレートとして, 以下のプライマーにより PCR を行うことにより作製した。すなわち, pGL2-CXCR4 (-167/+86) に対しては, CXCR4-UP (5'-GGGGTACCCAACTTAGGAAATGCCTCTGGGA-3') と CXCR4-DN1 (5'-GGGGTACC

AGCGGCGCATGCGCCGCGCTCGGAGCG-3') を使用し, pGL2-CXCR4 (-72/+86) に対しては, CXCR4-UP と CXCR4-DN2 (5'-CCGCTCGAGCCTCCATGGTAACCGCTGGT-3') を使用し, PCR 反応を行った。増幅された断片は pGL2 ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。

c) pcDNA3 (Invitrogen) をベースにした krüppel-like factor 2 (以下 KLF2 と略) と KLF2 の DNA 結合領域を欠失させた Δ KLF2 の両発現ベクターは, Sucharita Banerjee 博士と Mukesh K Jain 博士 (Cardiovascular Division, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA) により供与された²⁰⁾。

3) トランスフェクションおよび強制発現細胞の樹立

a) CXCR4 siRNA 発現株の樹立

100mm 径プラスチックペトリ皿 (Falcon; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) に 5×10^6 個の B88 細胞を植え込み, 10% FCS を含む DMEM にて 24 時間培養後, 5 µg の CXCR4 siRNA 発現ベクターあるいは 5 µg のコントロールベクターを, B88 細胞に Superfect (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてトランスフェクションした。48 時間後より, 400 µg/ml の Geneticin (以下 G418 と略, Invitrogen) 存在下に約 2 週間培養し, 出現した G418 耐性クローンをともに 20 クローンずつ回収した。各クローンより後述の方法で total RNA を回収し, 逆転写後, 定量性 PCR を行い, コントロール細胞に関してはクローン 13, 14, 15 細胞を, CXCR4 siRNA 発現細胞 (以下 B88-siCXCR4 細胞と略) に関しては発現の低下していたクローン 16, 17, 21 細胞を以後の実験に使用した。

b) ルシフェラーゼ遺伝子恒常的発現細胞 (以下 B88-luc と略) の樹立

a) と同様の条件下に, 5 µg の恒常的ルシフェラーゼ発現ベクター pGL3-control (Promega, Madison, WI, USA) と 0.5 µg のネオマイシン耐性能を有する pcDNA3 ベクターを導入した。48 時間後より, G418 (400 µg/ml) 存在下に約 2 週間培養し, 出現した G418 耐性クローンの全コロニーを一塊として回収し, 以後の実験に使用した。

c) CXCR4 ルシフェラーゼ発現細胞の樹立

a) と同様の条件下に, 5 µg の各種ルシフェラーゼ発現ベクターと 0.5 µg の pcDNA3 ベクターを導入した。48 時間後より, G418 (400 µg/ml) 存在下に約 2 週間培養し, 出現した G418 耐性クローンの全コロニーを一塊として回収し, 以後の実験に使用した。

d) KLF2 発現ベクターの導入法

a) と同様の条件下に, 5 µg の各種 KLF2 発現ベクターを導入した。導入後, 48 時間後に細胞を回収し, 後述の定量性 RT-PCR, ルシフェラーゼアッセイ, 細胞遊走能の検索, クロマチン免疫沈降法 (以下 ChIP assay と略)

に使用した。

e) KLF2 siRNA 導入法

10% FCS を含む DMEM にて24時間培養した 3×10^5 個の B88 細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用し、3 種類の KLF2 siRNA (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA) を混合したものあるいは、negative control siRNA (B-Bridge International) を、それぞれ最終濃度が 20 nM, 200 nM となるようにトランスフェクションした。その後10% FCS を含む DMEM にてそれぞれ48時間、72時間培養し、後述の方法により total RNA を回収後、定量性 RT-PCR にて KLF2, CXCR4 mRNA の発現量を測定した。

4) RNA 調製法

Total RNA は TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen) を用いて抽出した。すなわち、100 mm プラスティックペトリ皿あたり 1 ml の TRIZOL[®] にて細胞を溶解したのち、遠心し上清を回収した。その上清を 0.2 ml クロロホルム (和光純薬、大阪) で処理した後、混在する蛋白の除去を行った。得られた上清に 0.5 ml のイソプロピルアルコール (和光純薬) を加え遠心した後、沈渣を 70% エタノール (和光純薬) にて洗浄、乾燥し、0.1% (V/V) ジエチルピロカルボネート水溶液 (以下 DEPC 処理水と略、Sigma) に溶解した。なお、各種抗癌剤処理時の CXCR4 mRNA の発現検索においては、対数増殖期の B88 細胞に 10 μ g/ml の 5-FU, 10 μ g/ml の cis-diamminedichloroplatinum (以下 CDDP と略), 50 μ g/ml のベスナリノン [OPC-8212; 大塚製薬 (東京) より供与] を添加後、経時的に RNA を回収した。

5) 定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (以下 RT-PCR と略)

5 μ g の total RNA に 5 x first strand buffer (Invitrogen) を加え、65℃, 5 分間加熱した後、水中に 5 分間静置し、これに最終濃度がそれぞれ 5 μ M のランダムプライマー (Invitrogen), 10 μ M の dithiothreitol (以下 DTT と略, Invitrogen), 500 μ M の deoxyribonucleoside 5'-triphosphates (以下 dNTPs と略, 宝酒造), 10 U/ μ l の Moloney Murine Leukemia Virus 逆転写酵素 (Invitrogen) を加え、42℃, 60分間反応させた後、95℃, 5 分間加熱し反応を停止させ cDNA を得た。得られた cDNA のうち 2 μ l を鋳型とし、CXCR4, KLF2, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (以下 GAPDH と略) の発現を QuantiTect[™] Gene Expression Assays (Hs-CXCR4; Qiagen) あるいは Taqman[®] gene expression assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) と ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて検索した。

6) フローサイトメトリー

90% コンフレントの状態にある B88 細胞を回収

し、4% パラホルムアルデヒド (和光純薬) にて 4℃, 10分間処理した後、Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ を含まないダルベッコのリン酸緩衝液 [以下 D-PBS (-) と略, Sigma] を用いて洗浄した。100倍希釈した CXCR4 モノクローナル抗体 (12G5; BioSource International, Camarillo, CA, USA) により30分間室温にて反応させた後、洗浄し、Phycoerythrin (以下 PE と略) 標識ヤギ抗マウス IgG (Serotec, 札幌) を30分間室温にて反応させた。洗浄後、EPICS flow cytometer (Coulter, San Jose, CA, USA) により細胞表面の CXCR4 の発現を検索した。なお、各種抗癌剤処理時の CXCR4 蛋白の発現検索においては、対数増殖期の B88 細胞に 10 μ g/ml の 5-FU, 50 μ g/ml のベスナリノン を添加後、同様に解析した。

7) カルシウム流入量

1×10^6 個の B88 細胞を D-PBS (-) にて洗浄し、トリプシン処理後、1 ml の Hank's balanced solution (Sigma) に溶解した 4 μ M の Fluo3-AM (Dojindo, 熊本) と 400 μ g/ml の Pluronic F-127 (Dojindo) にて 37℃, 30分間で処理した。HEPES-buffer [100 mM NaCl (和光純薬), 5 mM KCl (和光純薬), 1 mM Na₂HPO₄ (和光純薬), 5 mM glucose (和光純薬), 0.5 mM MgCl₂ (和光純薬), 10 mM HEPES (pH 7.5; 和光純薬), 1 mg/ml bovine serum albumin (以下 BSA と略, Sigma), 1 mM CaCl₂ (和光純薬)] にて洗浄後、同バッファー 1 ml に懸濁した。測定用チューブに移した細胞を EPICS flow cytometer にセットし、FL2 の蛍光を計測後、測定を一旦停止し、リコンビナント SDF-1 α (R&D, Minneapolis, MN, USA) を添加した際の FL2 蛍光を再度計測することにより、カルシウム流入量を測定した。

8) 細胞遊走能の解析

細胞遊走能は、Transwell (Corning, Corning, NY, USA) を用いて検証した。すなわち、200 μ l の血清非添加 DMEM に懸濁した 5×10^4 個の細胞を upper chamber に播種した後、lower chamber に 600 μ l の SDF-1 α 添加あるいは非添加 DMEM を加えた。24時間培養後、lower chamber 底部のポリカーボネート膜に付着した細胞を綿棒にて拭き取った。膜を通過して膜裏面に付着している細胞を固定後、ヘマトキシリンエオジン染色 (以下 H-E 染色と略) し、強拡大 ($\times 400$), 10視野における細胞数をカウントした。AMD3100 使用実験においては、1 μ g/ml の AMD3100 (Sigma) を、キナーゼ阻害実験においては、20 μ M の mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase (以下 MEK と略) 阻害剤である U0126 (Promega), あるいは 10 μ M の phosphatidylinositol 3-kinase (以下 PI3K と略) 阻害剤である wortmannin (Sigma) を、ベスナリノン使用実験においては、50 μ g/ml のベスナリノン upper chamber 内の細胞に添加した。

9) *in vivo* における実験的治療

BALB/c ノードマウス [日本クレア (Osaka, Japan)] は病原微生物の非存在下で飼育され、実験は徳島大学動物実験ガイドラインに従って行われた。マウスは8週齢になった段階で、各種実験に使用された。

a) CXCR4 siRNA によるリンパ節転移抑制能の検索

2×10^6 個の B88-siCXCR4 細胞 (clone 17) およびコントロール細胞 (clone 13) をノードマウス咬筋内に同所性移植し、30日後に屠殺した。屠殺時にマウス重量と腫瘍体積 [長径 \times (短径) $^2 \times 1/2$ により算出] を測定し、摘出した頸部リンパ節は重量測定、H-E 染色によりリンパ節転移の有無を判定した。

b) AMD3100 によるリンパ節転移抑制能の検索

2×10^6 個の B88-luc 細胞をノードマウス咬筋内に同所性移植後、翌日より CXCR4 選択的阻害剤である AMD3100 (2.5 mg/kg) と、コントロールとして同量の生理的食塩水を連日皮下投与し、28日後に屠殺した。屠殺時にマウス重量と腫瘍体積を測定し、摘出した頸部リンパ節は重量測定とルシフェラーゼ活性を測定することにより転移細胞数を定量化した。

c) キナーゼ阻害剤によるリンパ節転移抑制能の検索

5×10^6 個の IH-CXCR4 細胞をノードマウス咬筋内に同所性移植後、翌日より 100% DMSO (2.5 ml/kg) にて調整した U0126 (10 mg/kg), wortmannin (1.5 mg/kg), コントロールとして同量の 100% dimethylsulfoxide (以下 DMSO と略, 和光純薬) をそれぞれマウス腹腔内に3日おきに投与し、28日後に屠殺した。屠殺時にマウス重量と腫瘍体積を測定後、摘出した腫瘍を、後述のごとく、ウエスタンブロット法による extracellular signal-regulated kinase 1/2 (以下 ERK1/2 と略), Akt/protein kinase B (以下 PKB と略) の活性化の検索に使用した。摘出した頸部リンパ節については H-E 染色によりリンパ節転移の有無を判定した。

d) ベスナリノンによるリンパ節転移抑制能の検索

2×10^6 個の B88-luc 細胞をノードマウス咬筋内に同所性移植後、翌日より 0.5% のカルボキシメチルセルロース (以下 CMC と略; 第一薬品工業, 京都) 溶液に溶解したベスナリノンと、コントロールとして同量の CMC 溶液を5日間経口投与し、2日間休薬するスケジュールで14日間あるいは28日間投与した。28日後に屠殺し、摘出した頸部リンパ節は重量測定とルシフェラーゼ活性を測定することにより転移細胞数を定量化した。

10) 細胞増殖能の評価法

AMD3100 による B88 細胞の増殖能に与える影響は、3-(3,4-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (以下 MTT と略, Sigma) を用いて検索した。すなわち、96ウェルマイクロプレート (Falcon; Becton Dickinson Labware) に 1×10^4 個の細胞を播種し、翌日から AMD3100 を 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml で処理を開始した。24

時間、48時間細胞を培養した後、最終濃度が 1 mg/ml となるように MTT 溶液を加え、37℃で4時間反応させた後、形成された MTT formazan を 100 μ l の DMSO で溶解し、OD 590 nm にて吸光度を測定することで生細胞数を評価した。

11) ウエスタンブロット法

ノードマウスより摘出した組織を D-PBS (-) にて洗浄後、500 μ l の lysis buffer [20 mM Hepes (pH 8.0, 和光純薬), 1% NP-40 (Sigma), 10% glycerol (和光純薬), 2.5 mM EGTA (和光純薬), 2.5 mM EDTA (和光純薬), 1 mM PMSF (和光純薬), 10 μ g/ml leupeptin (和光純薬), 2 μ g/ml aprotinin (和光純薬)] を加え、ホモジナイズし室温にて5分静置した後、15,000 $\times g$ にて遠心後、上清を回収し、蛋白質抽出標品として実験に供した。抽出蛋白質の濃度は、Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。培養細胞から調製した蛋白標品に最終濃度 5% の 2-Mercaptoethanol (Sigma) を加え、100℃, 3分間加熱処理した。50 μ g の抽出蛋白を SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にて展開し、ニトロセルロース膜 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) に転写後、0.05% Tween20 (Sigma) -0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中に溶解した 5% スキムミルク (和光純薬) あるいは 5% BSA にてブロッキングを行い、一次抗体として上記ブロッキング液に1000倍希釈したリン酸化あるいは非リン酸化抗ヒト ERK1/2 または抗ヒト Akt/PKB 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を、二次抗体として horseradish peroxidase (以下 HRP) 標識抗抗ヒト IgG 抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) にて反応させた。その後、ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

12) ルシフェラーゼアッセイ

各種 CXCR4 コンストラクトを導入した 5×10^5 個の B88 細胞を、6ウェルマイクロプレート (Falcon; Becton Dickinson Labware) に播種し、翌日から 50 μ g/ml のベスナリノンで処理し、経時的に蛋白を cell culture lysis reagent (ピッカジーン, 東洋インク, 東京) にて抽出した。抽出蛋白に基質となるルシフェリンを含んだ luciferase assay kit (東洋インク) を添加し、Lumat LB9507 (BERTHOLD TECHNOLOGIES, Wildbad, Germany) によりルシフェラーゼ活性を測定した。また、摘出腫瘍におけるルシフェラーゼ活性は、腫瘍組織をホモジナイズ後、同様の方法にて測定した。

13) cDNA マイクロアレイ

B88 細胞のベスナリノン処理時における遺伝子発現変化の包括的解析は、50 μ g/ml のベスナリノンとコントロールとして DMSO にて48時間処理された細胞を用いて行った。すなわち、両細胞より total RNA を抽

出後、逆転写し、作製された cDNA を用い、DMSO 処理細胞由来 cDNA を Cy3 にて、ベスナリノン処理細胞由来 cDNA を Cy5 にて蛍光標識後、約18,000個のヒト遺伝子を搭載した Human 1A Oligo Microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて解析した (北海道システムサイエンス社、札幌)。

14) クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

CXCR4 のプロモーター領域に結合する蛋白質の解析は ChIP assay により行った。解析には ChIP assay kit (Upstate, Lake Placid, NY, USA) を使用した。B88 細胞を 50 µg/ml のベスナリノン処理あるいは未処理の状態、または pcDNA3 あるいは pcDNA3-KLF2 ベクターをトランスフェクション後、48時間培養した。D-PBS (-) にて洗浄後、10% formaldehyde/D-PBS (-) を終濃度 1% で添加し、37℃、15分間固定することにより、DNA-蛋白質をクロスリンクした。1 mM の PMSF と 1 µg/ml の aprotinin を添加した氷冷 D-PBS (-) にて洗浄後、細胞を回収し、lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin) を加え、細胞成分を可溶化した。次に細胞抽出液を10秒超音波処理した後、20秒間隔を取り、合計4回超音波破碎することにより、DNA を断片化した後、サンプルを ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.0, 167 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin) で10倍希釈した。これに protein A agarose を加え、4℃、30分間反応させた後、遠心した上清に 1 µg のラビット抗 KLF2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を添加し、4℃で一晩反応させた。次に 50 µl protein A agarose を加え、4℃で1時間反応させた後、以下に示す(1)–(4)のバッファーによりそれぞれ、4℃、3分間の洗浄を行った。(1) Low Salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl), (2) High Salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl), (3) LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), (4) TEbuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) × 2 回。その後、DNA-蛋白質複合体を elution buffer (10 mM DTT, 1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) により溶出させた後、最終濃度が 0.2 M となるように NaCl を加え、65℃、6時間反応させ、DNA-蛋白質複合体のクロスリンクを外した。Proteinase K を最終濃度 40 µg/ml となるように加え、45℃で1時間反応させることにより、蛋白質を分解した後、phenol-chloroform 法、エタノール沈殿により抽出した DNA の一部を PCR に使用した。PCR プライマーは CXCR4 プロモーターの -401 から -142 の領域に相当する CXCR4-ChIP-UP (5'-CAGCAAGTCACTCCC-3') と CXCR4-ChIP-DN (5'-GGAGAGGTGCGCGGC-3') を使用した。

15) 統計学的処理

異なるグループの平均値の間における有意差検定は、one-way ANOVA を用い Stat View 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) 上で処理し、P<0.05 で有意と評価した。

結 果

1) CXCR4 siRNA 導入による CXCR4 の発現抑制効果

CXCR4 の発現抑制によるリンパ節転移抑制効果を検討するために、siRNA 法を用いて CXCR4 のノックダウンを行った。B88 細胞に CXCR4 siRNA を導入し得られた G418 耐性コロニーより20個のクローンを選択し、CXCR4 mRNA の発現を定量性 RT-PCR 法にて検索した。その結果、clone 16, 17, 21細胞において CXCR4 mRNA レベルが最も低く、コントロール細胞に比較し40%から60%に抑制されていた (図1a)。最も抑制効果の強かった clone 16, 17細胞における CXCR4 蛋白の発現をフローサイトメトリーにて検索した (図1b)。その結果、コントロール細胞では77.6%の細胞が CXCR4 蛋白を発現していたのに対し、clone 16, 17細胞では、CXCR4 を発現している細胞は半分以下の39.4%と32.6%であり、この結果は、CXCR4 mRNA レベルと同様に抑制されていた。

2) CXCR4 siRNA 導入による CXCR4 の機能抑制効果

B88-siCXCR4 細胞における CXCR4 のノックダウン効果が機能的であるか確認するために、SDF-1 刺激によるカルシウム流入量を検索した (図2a)。その結果、B88-siCXCR4 細胞 (clone 17) はコントロール細胞に比較し、SDF-1 刺激後のカルシウム流入量が顕著に抑制されていた。次に B88-siCXCR4 細胞における SDF-1 刺激による細胞遊走能の変化を検索した (図2b)。コントロール細胞においては、有意な細胞遊走の亢進が認められるのに対し、B88-siCXCR4 細胞 (clone 16, 17) においては、SDF-1 処理によりわずかな細胞遊走の亢進が認められるものの、処理前と比較して統計学的な有意差は認めなかった。以上より CXCR4 siRNA 導入により B88 細胞の CXCR4 が機能的に抑制されている事が明らかとなった。

3) CXCR4 siRNA 導入による B88 細胞のリンパ節転移抑制効果

CXCR4 ノックダウンによるリンパ節転移抑制効果を検索すべく、ヌードマウス咬筋内同所性移植モデルを用いてリンパ節転移実験を行った。その結果、B88-siCXCR4 細胞移植群においてはコントロール細胞移植群に比較し、転移リンパ節の個数、リンパ節重量、腫瘍体積において有意な抑制が認められ、さらにマウスの体重減少は有意に抑制されていた (表1)。以上より、CXCR4 を発現している口腔扁平上皮癌細胞における CXCR4 の発現抑制は、リンパ節転移抑制に有用である可能性が示唆された。

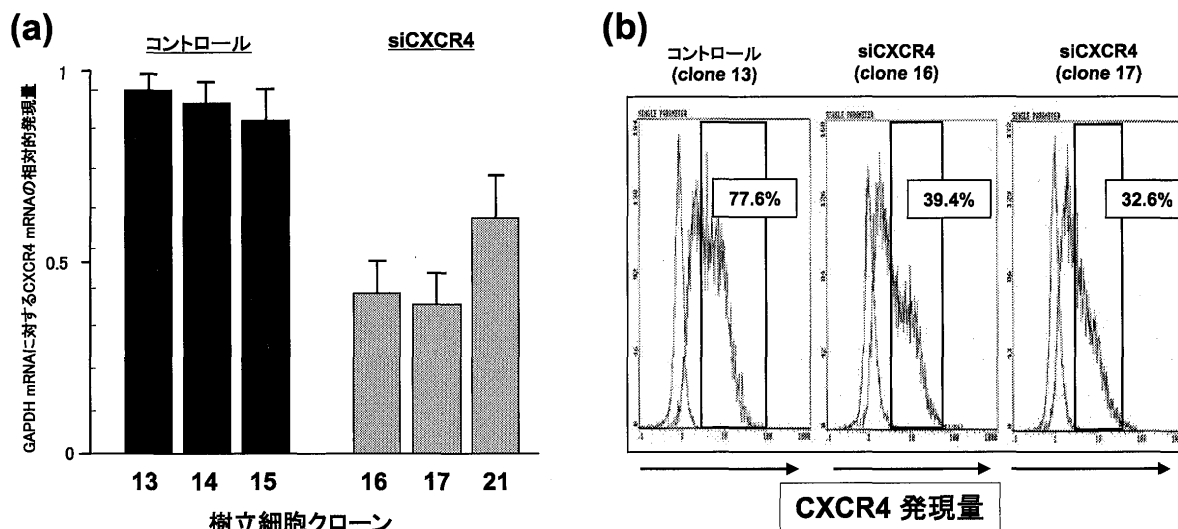


図1 CXCR4 siRNA 発現ベクターを導入した B88 細胞クローンにおける CXCR4 の発現抑制
(a) CXCR4 siRNA 発現ベクターとコントロールベクターを B88 細胞に導入後、G418 耐性コロニーより樹立したそれぞれ 3 クローンより total RNA を回収し、リアルタイム PCR 法にて CXCR4 mRNA の発現を検索した。CXCR4 siRNA 導入クローン (16, 17, 21) はコントロール細胞クローン (13, 14, 15) に比較して、CXCR4 mRNA の発現が低下していた。(b) CXCR4 siRNA 導入細胞クローン (B88-siCXCR4 細胞) における CXCR4 蛋白の発現をフローサイトメトリーにて検索した。B88-siCXCR4 細胞は、コントロール細胞に比較して CXCR4 蛋白の発現が低下していた。四角の領域内とそれぞれに示された数字は陰性対照 (一次抗体未処理) と比較したときの、CXCR4 陽性細胞数の比率を表している。全ての実験は 3 回繰り返して行い、同様の結果を得た。

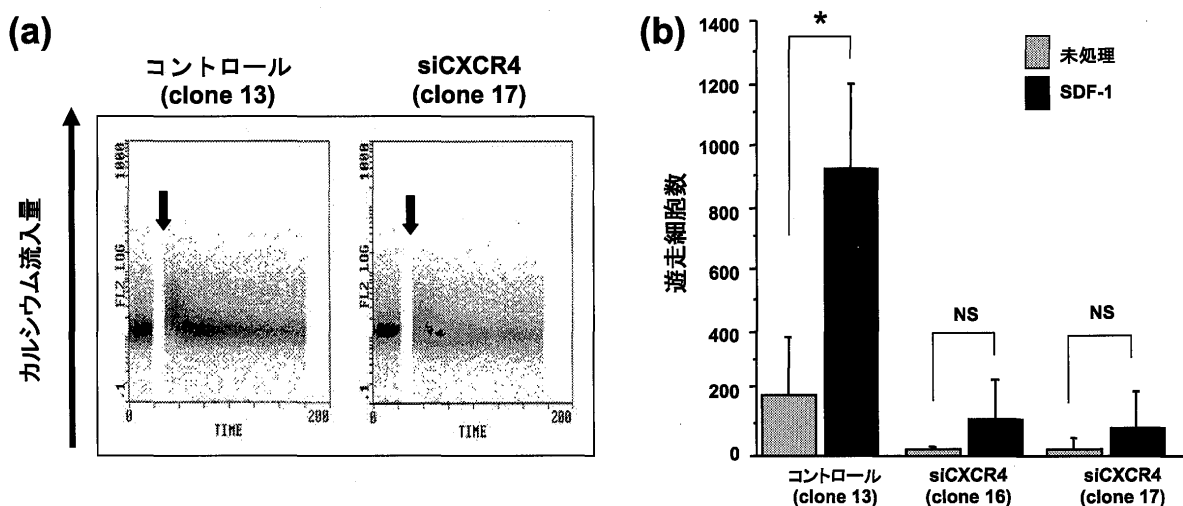


図2 CXCR4 siRNA 発現ベクターを導入した B88 細胞における CXCR4 の機能的発現抑制
(a) SDF-1 刺激後のコントロール細胞 (clone 13 細胞) と B88-siCXCR4 細胞 (clone 17 細胞) におけるカルシウム流入量をフローサイトメトリーにて検索した。コントロール細胞では SDF-1 刺激後短時間で細胞内カルシウムの上昇が認められたが、B88-siCXCR4 細胞では減弱していた。矢印は SDF-1 添加を示す。(b) コントロール細胞 (clone 13 細胞) と B88-siCXCR4 細胞 (clone 16, 17 細胞) における SDF-1 に対する細胞遊走能を検索した。コントロール細胞では SDF-1 刺激による有意な細胞遊走が認められたが (*, $P < 0.001$), B88-siCXCR4 細胞では認められなかった (NS, 有意差なし)。全ての実験は 2 回繰り返して行い、同様の結果を得た。

表1 咬筋内同所性移植モデルにおける CXCR4 siRNA のリンパ節転移抑制効果

	マウス番号	転移リンパ節数	転移リンパ節重量 (mg)	腫瘍体積 (mm ³)	体重 (g)	
B88-siCXCR4 (clone 17)	1	1	13.8	406.3	20	
	2	0	0	405.0	20	
	3	0	0	392.9	19	
	4	1	9.50	208.3	22	
mean±SD		0.500±0.577*	5.825±6.951*	353.1±96.75*	20.25±1.258*	
mock	1	1	12.4	515.0	19	
	2	2	18.8	814.1	18	
	3	2	23.1	595.4	15	
	4	3	18.0	550.0	18	
	5	2	19.1	526.5	15	
mean±SD		2.000	±0.707	18.28±3.835	600.2±123.5	17.00±1.871

*P<0.05

4) CXCR4 選択的阻害剤 AMD3100 の増殖, 細胞遊走に与える影響

CXCR4 siRNA 投与による実験的治療は, 投与量や腫瘍内濃度の維持, 投与経路の確立が困難であることが予想されたため, CXCR4 選択的阻害剤である AMD3100²¹⁾ による実験的治療を行うこととした。まず, *in vitro* における AMD3100 の効果を検討する目的で, B88 細胞の細胞増殖に与える影響を MTT assay にて検索した (図 3 a)。その結果, AMD3100 投与群は非投与群に比較し, B88 細胞の増殖能に著明な影響を与えなかった。次に AMD3100 の SDF-1 刺激による細胞遊走能の変化を検索すべく, 細胞遊走能の検索を行った (図 3 b)。AMD3100 は B88 細胞における SDF-1 誘導性の細胞遊走を有意に抑制したことより, CXCR4 を機能的に阻害していることが明らかとなった。

5) AMD3100による B88 細胞のリンパ節転移抑制効果

そこで, AMD3100 を用いて, B88 細胞のリンパ節転移に対する実験的治療を行った (図 3 c)。B88 細胞における転移細胞数の定量化を行うために, B88 細胞にルシフェラーゼ発現ベクターを導入した B88-luc 細胞をヌードマウス咬筋内に同所性移植後, AMD3100 を20日間マウス大腿部皮下に投与し, 転移リンパ節のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果, AMD3100 投与群では生理的食塩水投与群と比較し, ルシフェラーゼ活性が有意に低下しており, 正常マウスの頸部リンパ節におけるルシフェラーゼ活性とはほぼ同程度であった。また, 病理組織学的な検索は行っていないが, AMD3100 におけるリンパ節数とリンパ節重量は, AMD3100 処理群におい

て有意に低下していた (表 2)。以上より CXCR4 を発現している口腔扁平上皮癌において, AMD3100 による CXCR4 の阻害は, リンパ節転移抑制に有用である可能性が示唆された。

6) キナーゼ阻害剤によるリンパ節転移抑制効果

既に我々は SDF-1/CXCR4 シグナルが ERK1/2 および Akt/PKB シグナル伝達経路を活性化することを見出している¹⁴⁾。癌細胞における一般的な増殖・浸潤転移シグナルは, チロシンキナーゼ受容体から PI3K-Akt を介する経路や ras-ERK1/2 を介する経路であることが明らかにされていることから^{22, 23)}, これら経路に対するキナーゼ阻害薬を用いることで, 細胞増殖, 浸潤, 転移を効率的に抑制できると考えられる。そこで, SDF-1 誘導性の細胞遊走に与える MEK 阻害剤 U0126 あるいは, PI3K 阻害剤 wortmannin の影響を検索した (図 4 a)。その結果, U0126, wortmannin は, IH-CXCR4 細胞における SDF-1 誘導性の細胞遊走を有意に抑制した。さらに双方の阻害剤を併用すると SDF-1 添加後の細胞遊走はほぼ完全にブロックされた (図 4 a)。次にヌードマウス咬筋内同所性移植モデルにおける U0126, wortmannin の効果を検討した。腹腔内投与によるキナーゼ阻害剤の効果を確認する目的で, 原発巣における ERK1/2, Akt の活性化をウエスタンブロット法にて検索したところ, それぞれの阻害剤処理群において, ERK1/2 あるいは Akt/PKB 活性が抑制されていた (図 4 b)。またリンパ節転移の有無を病理組織学的に検索したところ, コントロール群に比較し, U0126, wortmannin は共にリンパ節転移を著明に抑制したものの, 予想に反して腫瘍体積に変化は認められ

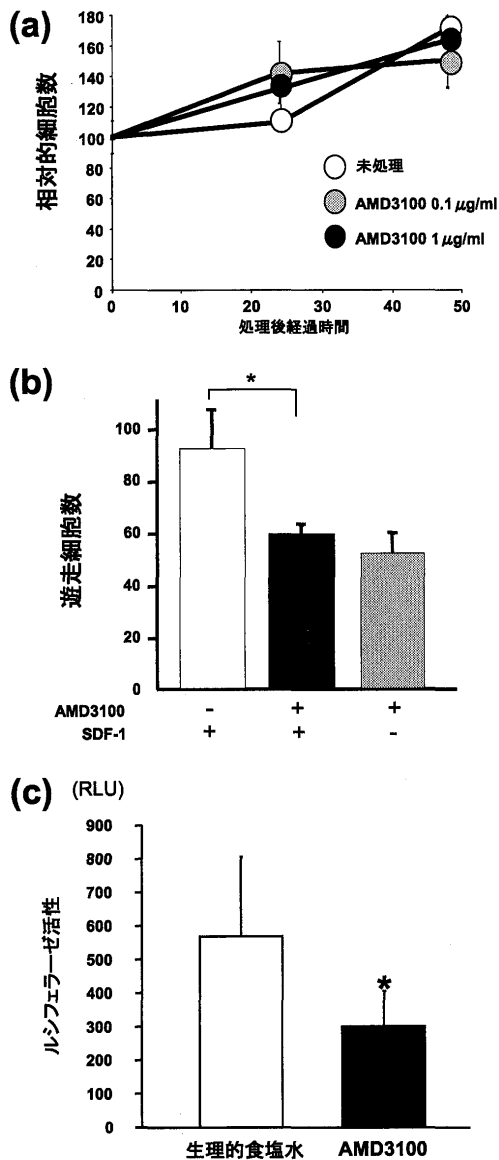


図3 AMD3100によるB88細胞の増殖に与える影響と、SDF-1誘導性の細胞遊走抑制効果ならびにリンパ節転移抑制効果

(a) B88細胞の増殖に与えるAMD3100の影響をMTT assayにて検索した。各点は8検体の平均値と標準偏差を、0日を基準として算出したものである。AMD3100は、B88細胞の増殖に著明な影響を与えなかった。(b) SDF-1誘導性の細胞遊走に与えるAMD3100の影響を*in vitro*にて検索した。AMD3100は、SDF-1誘導性の細胞遊走を有意に抑制した(*, $P<0.01$)。実験は2回繰り返して行い、同様の結果を得た。(c) ルシフェラーゼ遺伝子発現型B88細胞のリンパ節転移に与えるAMD3100の影響をヌードマウス同所性移植モデルにより検索した。AMD3100はヌードマウス背部に連日皮下投与した。摘出リンパ節におけるAMD3100処理群のルシフェラーゼ活性は、生理的食塩水投与群と比較して、有意に低下していた(*, $P<0.01$)。未処理は腫瘍非担癌マウスのリンパ節におけるルシフェラーゼ活性を示す。

表2 咬筋内同所性移植モデルにおけるAMD3100のリンパ節転移抑制効果

	マウス番号	リンパ節数	リンパ節重量 (mg)	腫瘍体積 (mm^3)	体重 (g)
AMD3100	1	3	10.1	845.0	14
	2	2	8.60	1098	19
	3	2	8.60	680.5	15
	4	3	7.30	283.5	21
	mean \pm SD	2.500 \pm 0.577*	8.650 \pm 1.145*	638.1 \pm 360.3	17.25 \pm 3.304
生理食塩水	1	5	33.5	1125	15
	2	4	23.5	620.8	20
	3	3	13.9	171.5	14
	4	4	36.0	864.0	17
	mean \pm SD	4.000 \pm 0.816	26.73 \pm 10.11	578.8 \pm 304.9	16.50 \pm 2.646

* $P<0.05$

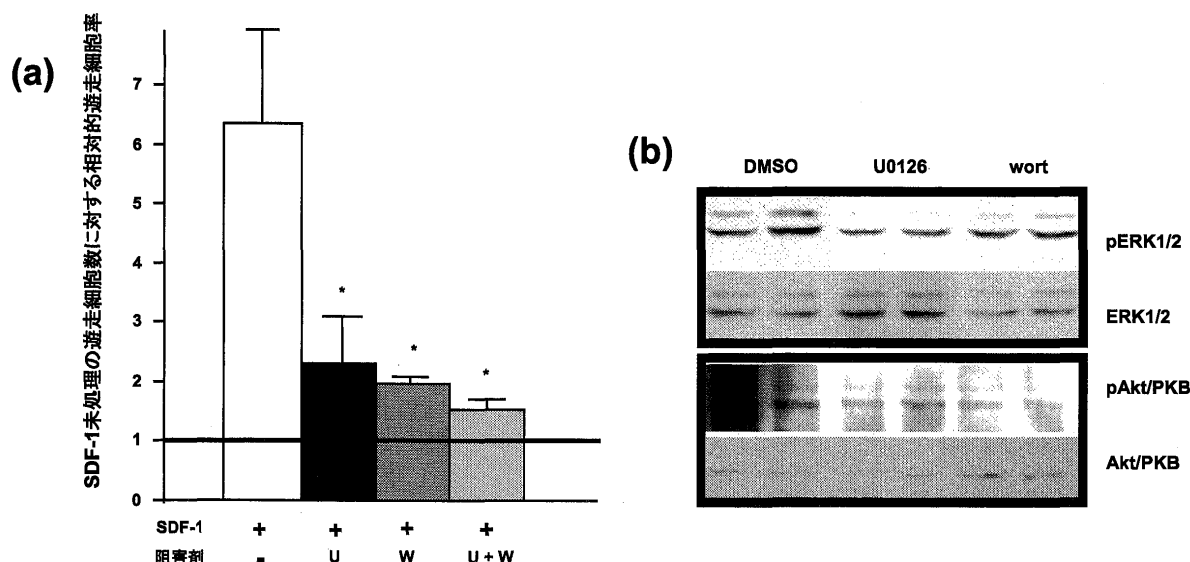


図4 キナーゼ阻害剤による SDF-1 誘導性の細胞遊走抑制と同所性移植マウスに与える影響

(a) IH-CXCR4 細胞における SDF-1 誘導性の細胞遊走は MEK 阻害剤 (U, U0126), PI3K 阻害剤 (W, wortmannin) 処理により有意に抑制された (*, $P < 0.01$)。遊走細胞率は SDF-1 未処理の遊走細胞数を基準として算出した。実験は 2 回繰り返して行い、同様の結果を得た。(b) ノードマウス咬筋内に IH-CXCR4 細胞を同所性移植し, U0126, wortmannin をそれぞれ腹腔内投与した。28 日後に屠殺, 原発腫瘍より抽出した蛋白を用い, ウエスタンブロット法にてキナーゼ阻害剤による ERK1/2, Akt/PKB の抑制効果を検討した。in vivo においても MEK 阻害剤である U0126 は ERK1/2 のリン酸化を, PI3K 阻害剤である wortmannin は Akt/PKB のリン酸化を抑制した。pERK1/2, pAkt/PKB はリン酸化型を, ERK1/2, Akt/PKB はそれぞれの総蛋白を示している。

ず, 阻害剤処理群において grade 3 (20% 以上の体重減少) の著しい体重減少が認められた (表 3)。

7) CXCR4 発現抑制作用を有する抗癌剤の検索

キナーゼ阻害剤は原発巣の増殖抑制作用を有さず, 副作用も大きいことから, 投与法が確立された増殖抑制作用を有する既存の抗癌剤の中から, CXCR4 の発現抑制作用を有する薬剤を検索した。まず口腔癌の治療によく用いられる抗癌剤である, CDDP および 5-FU による B88 細胞における CXCR4 mRNA の発現を定量性 RT-PCR 法にて検索した。その結果, 双方の薬剤処理による CXCR4 mRNA レベルに著明な変化は認められなかった (図 5 a)。そこで, 増殖抑制作用や分化誘導活性など, 種々の作用機序を有することが明らかにされている新規抗癌剤ベスナリノン²⁴⁾ による CXCR4 mRNA 発現レベルの変化を検討した。その結果, コントロール, CDDP, 5-FU に比較し, ベスナリノン処理細胞においてのみ CXCR4 mRNA レベルの有意な発現低下が認められた (図 5 a)。次に蛋白レベルにおける発現変化を検索したところ, ベスナリノンのみが CXCR4 蛋白の発現を低下させた (図 5 b)。

8) 新規抗癌剤ベスナリノンによるリンパ節転移抑制効果 SDF-1 誘導性の細胞遊走に与えるベスナリノンの影響

表3 咬筋内同所性移植モデルにおけるキナーゼ阻害剤のリンパ節転移抑制効果

投与薬	リンパ節転移	腫瘍体積 (mm ³)	体重 (g)
DMSO (2.5 ml/kg)	6/8	22.3 ± 15.3	25.2 ± 1.3
U0126 (10 mg/kg)	1/7	19.6 ± 13.0	16.6 ± 2.2*
wortmannin (1.5 mg/kg)	2/7	25.1 ± 12.8	16.3 ± 1.5*

*, grade3 (20% 以上) の体重抑制あり

を検索したところ, ベスナリノン処理群において, B88 細胞における SDF-1 誘導性の細胞遊走は有意に抑制された (図 6 a)。そこで, B88-luc 細胞を用い, ノードマウス咬筋内同所性移植モデルにおけるベスナリノンの効果を検討した。B88-luc 細胞を移植後, 休薬期間も含め, 14 日間あるいは 28 日間のベスナリノン経口投与を行ったところ, 28 日間の投与群において, 摘出リンパ節のサイズはコントロールである CMC 投与群に比較し明らかに減少していた (図 6 b)。またベスナリノン投与群ではコントロール群と比較して摘出リンパ節重量 (図 6 c), ルシフェラーゼ活性の有意な低下が認められた (図 6 d)。

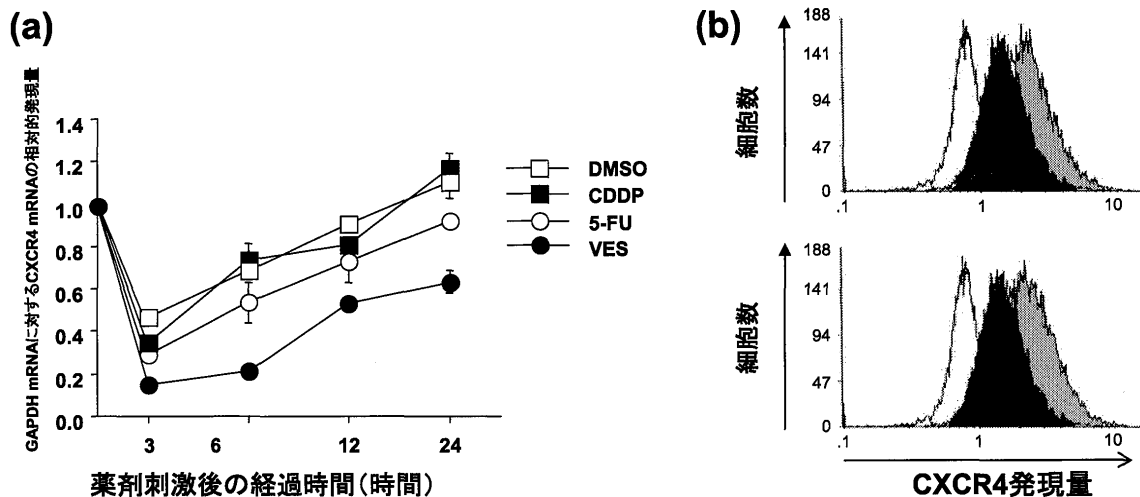


図5 ベスナリノンによる CXCR4 の発現抑制効果

(a) B88 細胞を各種抗癌剤 (CDDP, 5-FU, ベスナリノン) にて処理し, 経時的に total RNA を回収し, リアルタイム RT-PCR を行った。ベスナリノンによる CXCR4 mRNA の発現減少が認められた。(b) B88 細胞をベスナリノン (黒色), コントロール DMSO (上段灰色), 5-FU (下段灰色) にて処理後, 12時間回収し, CXCR4 蛋白の発現をフローサイトメトリーにて確認した。ベスナリノン処理による CXCR4 蛋白の発現は, DMSO あるいは 5-FU 処理に比較して, 約半減していた。全ての実験は 3 回繰り返して行い, 同様の結果を得た。

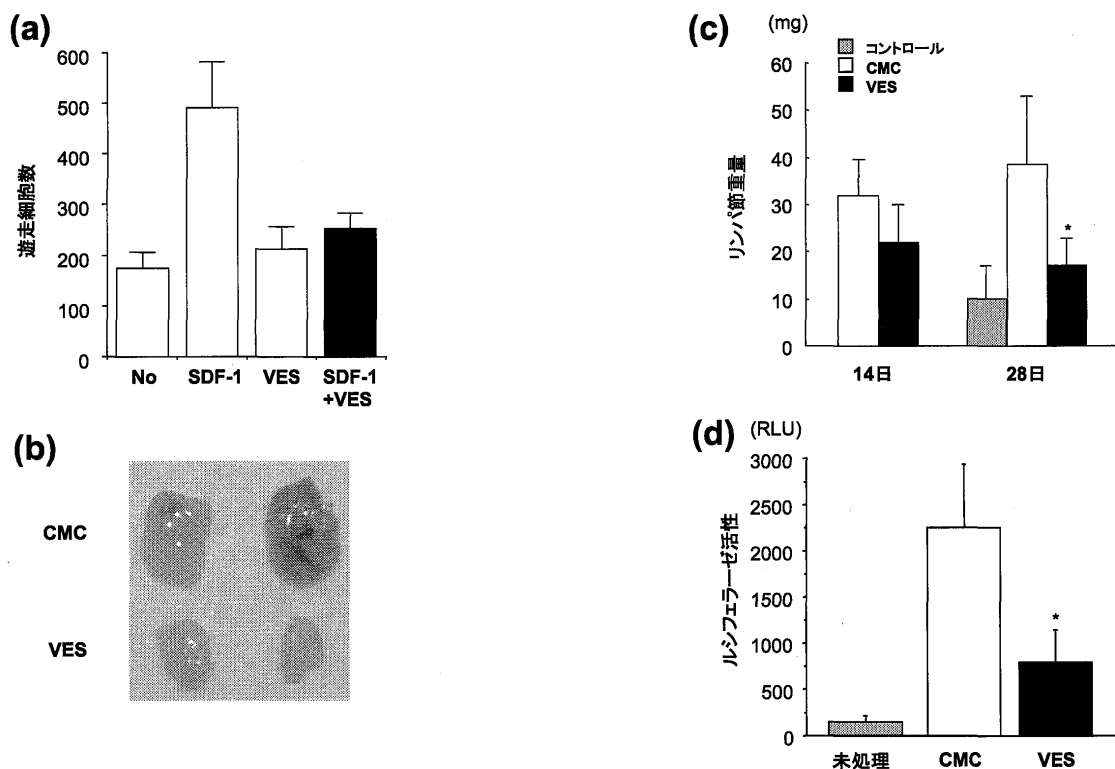


図6 ベスナリノンによる SDF-1 誘導性の細胞遊走抑制とリンパ節転移抑制

(a) SDF-1 誘導性の細胞遊走に与えるベスナリノンの影響を検索した。ベスナリノン処理した B88 細胞においては, SDF-1 誘導性の細胞遊走は認められなかった。実験は 2 回繰り返して行い, 同様の結果を得た。(b-d) ルシフェラーゼ発現型 B88 細胞をヌードマウス咬筋内に同所性移植し, 翌日より休薬期間を含み, ベスナリノンを 14 日あるいは 28 日間経口投与後, 摘出リンパ節を観察した。(b) ベスナリノンは B88 細胞担癌マウスにおいて, 顎下リンパ節サイズを明らかに抑制した。(c) ベスナリノンは B88 細胞担癌マウスにおいて, CMC 投与群に比較し, リンパ節重量を有意に抑制した (*, $P < 0.05$)。 (d) ベスナリノンは B88 細胞担癌マウスにおいて, CMC 投与群に比較し, 摘出リンパ節におけるルシフェラーゼ活性を有意に抑制した (*, $P < 0.05$)。

なお、ベスナリノン投与による原発巣の腫瘍体積、ルシフェラーゼ活性に変化は認められなかった（データは示していない）。

9) ベスナリノンによる CXCR4 の転写調節機構

ベスナリノンが CXCR4 の発現を抑制することで、リンパ節転移抑制作用を発揮する可能性が示唆されたため、ベスナリノンによる CXCR4 の転写調節機構につき解析を行った。ヒト CXCR4 プロモーターにドライブさ

れる種々のルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作成し、B88 細胞に導入後、ベスナリノン刺激によるルシフェラーゼ活性を経時的に測定した（図 7 a-g）。その結果、プロモーター領域を転写開始地点から -300 bp に欠失させたコンストラクトまでは、ベスナリノン処理によるルシフェラーゼ活性の経時的な減少が認められ、48 時間で最大の約 1/3 に低下していた（図 7 a-c, g）。しかしながら、-167 bp に欠失させたコンストラクトからは、ベスナリノンによる反応性はほとんど認められな

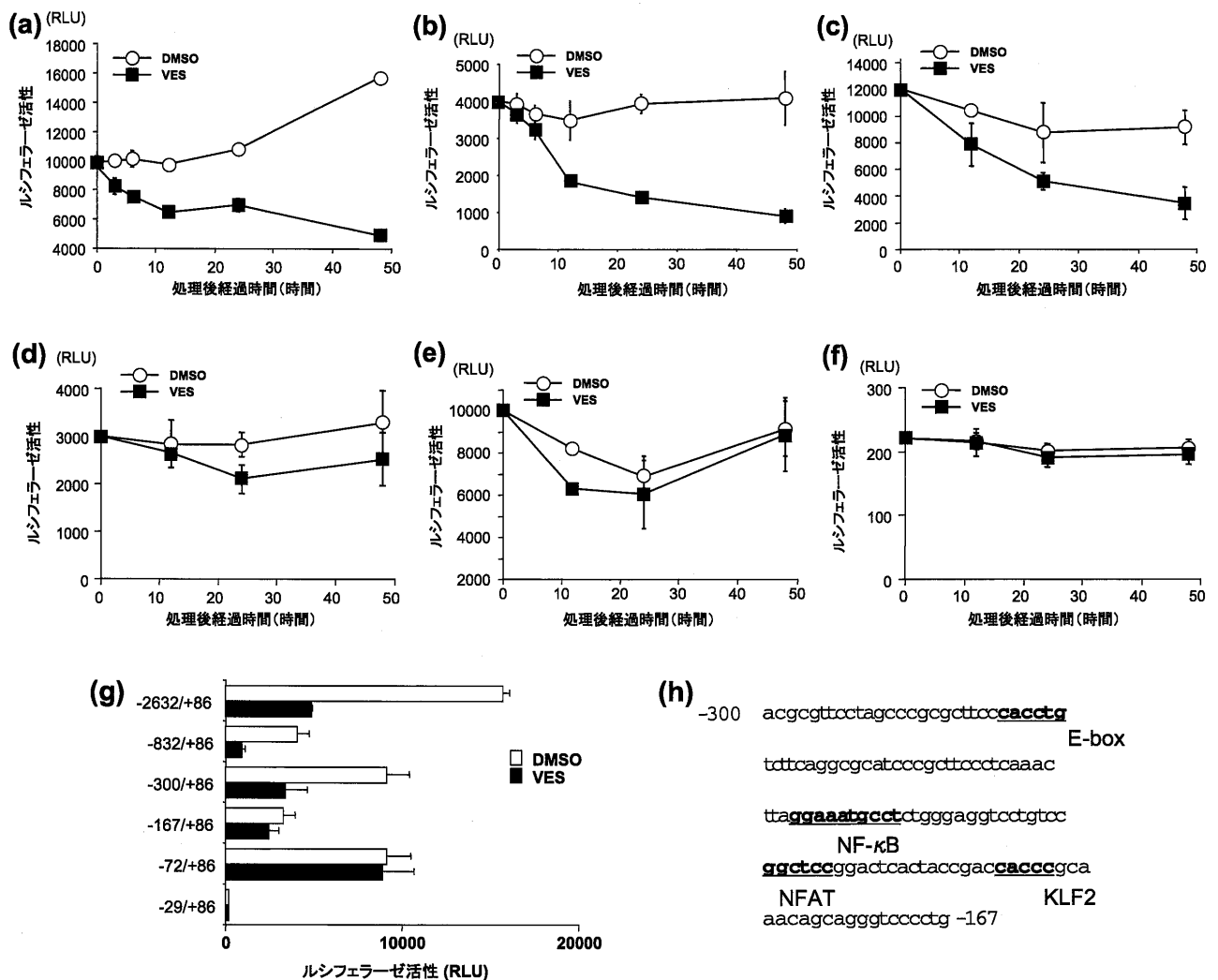


図 7 ベスナリノンによる CXCR4 の転写調節機構

CXCR4 プロモーターにドライブされる種々のルシフェラーゼコンストラクト (a-f) を作製し、B88 細胞に導入後、ベスナリノン刺激によるルシフェラーゼ活性を経時的に測定した。その結果、転写開始地点より 300 bp 上流まで欠失させたコンストラクトまでは、ベスナリノンによるルシフェラーゼ活性の減少が認められたが、167 bp 上流まで欠失させたコンストラクトでは、ベスナリノンによる活性の変化は認められなかった。全ての実験は 3 回繰り返して行い、同様の結果を得た。(a) -2632/+86, (b) -832/+86, (c) -300/+86, (d) -167/+86, (e) -72/+86, (f) -29/+86 のコンストラクトを示している。(g) ベスナリノン処理後 48 時間経過した時点における CXCR4 ルシフェラーゼ活性を示す。転写開始地点より 167 bp 上流まで欠失させたコンストラクトにおける、ベスナリノン処理後の活性変化は認められない。(h) 転写開始地点より -300 bp から -167 bp における CXCR4 プロモーター配列を示す。E-box 蛋白, NF-κB, NFAT, KLF などの種々の転写因子結合領域が存在する。

かった (図 7 d-g)。以上の結果より, CXCR4 プロモーターにおけるベスナリノン反応性領域は, 転写開始地点から上流の-300から-167までの134 bp の領域内に存在していることが示唆された。

10) ベスナリノン反応性転写因子の検索

ベスナリノン反応性領域には E-box タンパク, nuclear factor- κ B (以下 NF- κ B と略), nuclear factor of activated T cells (以下 NFAT と略), KLF など様々な転写因子結合領域が存在する (図 7 h)。そこで, ベスナリノン反応性領域に結合する転写因子を, 48時間ベスナリノン処理した B88 細胞より抽出した RNA を用い, cDNA マイクロアレイ法により検索した。その結果, 様々な遺伝子の発現変化が認められたが, ベスナリノン処理にて発現上昇

を認めた遺伝子群 (表 4), 発現低下を認めた遺伝子群 (表 5) の中で, ベスナリノン反応性領域に結合しうる転写因子は KLF2 のみであった。

11) ベスナリノンによる CXCR4 の発現抑制に及ぼす KLF2 の影響

ベスナリノンによる B88 細胞における KLF2 mRNA の発現変化を定量性 RT-PCR にて検索したところ, ベスナリノン処理により KLF2 mRNA の発現は経時的に上昇していた (図 8 a)。またこの条件下で CXCR4 mRNA レベルは, 図 5 a と同様に低下していた (データには示していない)。次に KLF2 の CXCR4 プロモーターへの結合能を検索すべく, ChIP assay を行った。その結果, ベスナリノン処理細胞において, KLF2 の CXCR4 プロ

表 4 ベスナリノン処理にて発現上昇を認めた遺伝子群

略名	遺伝子名	変化量(倍)
KLF2	Homo sapiens Kruppel-like factor 2 (lung)	4.90
GAL3ST1	Homo sapiens galactose-3-O-sulfotransferase 1	4.04
IGFBP3	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 3	3.56
HSPA1A	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A	2.81
FLJ13614	Homo sapiens hypothetical protein FLJ13614	2.55
HSPA1L	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1-like	2.49
FLJ13614	Homo sapiens hypothetical protein FLJ13614	2.43
FLJ13614	Homo sapiens hypothetical protein FLJ13614	2.41
ECM2	Homo sapiens extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific	2.33
HSPA1A	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A	2.31

表 5 ベスナリノン処理にて発現低下を認めた遺伝子群

略名	遺伝子名	変化量(倍)
RRM2	Homo sapiens ribonucleotide reductase M2 polypeptide	5.54
SHCBP	Homo sapiens likely ortholog of mouse Shc SH2-domain binding protein 1(SHCBP1)	3.66
FLJ10858	Homo sapiens DNA glycosylase hFPG2 (FLJ10858)	3.63
BIRC5	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	3.51
MGC21394	Homo sapiens protease inhibitor H	3.47
Spc25	Homo sapiens kinetochore protein Spc25	3.44
HCAP-G	Homo sapiens chromosome condensation protein G	3.44
BUB1	Homo sapiens BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	3.36
CDCA1	Homo sapiens cell division cycle associated 1	3.36
C10orf3	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 3	3.29

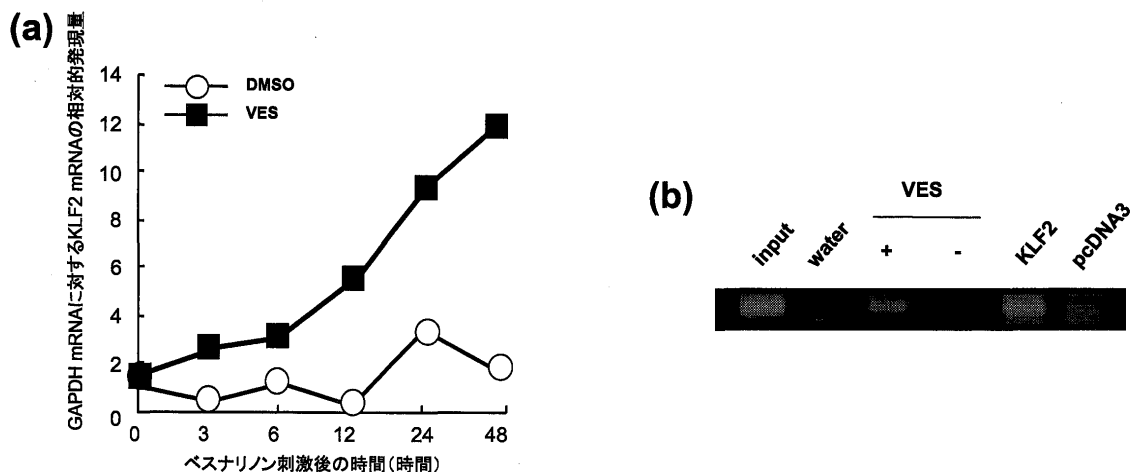


図8 ベスナリノンによる KLF2 の発現抑制効果

(a) B88 細胞をベスナリノンにて処理し、経時的に total RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR を行った。ベスナリノン処理により KLF2 mRNA の発現は経時的に上昇していた。(b) KLF2 の CXCR4 プロモーターへの結合能を ChIP assay にて検索した。その結果、ベスナリノン処理細胞において KLF2 の CXCR4 プロモーターへの結合能の増加していた。また、KLF2 を強制発現させた細胞においても、コントロールである pcDNA3 を導入した細胞と比較して、KLF2 の CXCR4 プロモーターへの結合能が増加していた。全ての実験は 2 回繰り返して行い、同様の結果を得た。

モーターへの結合能の増加が認められた (図 8 b)。また、KLF2 を強制発現させた細胞においても、コントロールである pcDNA3 を導入した細胞と比較して、KLF2 の CXCR4 プロモーターへの結合能が増加していた。(図 8 b)。以上より KLF2 は CXCR4 に対して転写抑制因子として働くことが予想されたため、KLF2 遺伝子導入による CXCR4 mRNA の発現変化を定量性 RT-PCR 法にて検索した。その結果、pcDNA3 ベクターあるいは KLF2 の DNA 結合領域を欠失させた Δ KLF2 ベクターを導入した細胞に比較して、KLF2 を導入した細胞では CXCR4 の発現が著しく低下していた (図 9 a)。また KLF2 遺伝子導入による CXCR4 プロモーター活性の変化を検索した結果、KLF2 遺伝子を導入した B88 細胞では CXCR4 プロモーター活性が有意に低下しており (図 9 b)、これらの結果は COS-7 細胞を用いた系においても同様に再現していた (図 9 c)。そこで、KLF2 による CXCR4 の発現低下が実際に SDF-1 による細胞遊走能に影響しているか否かを検索したところ、KLF2 遺伝子を導入した B88 細胞ではコントロール細胞に比較して、SDF-1 反応性の細胞遊走率が有意に低下していた (図 9 d)。以上よりベスナリノンは KLF2 の発現上昇を介して、CXCR4 の発現を低下させることが示唆された。

12) KLF2 ノックダウンによる CXCR4 の発現変化

KLF2 が CXCR4 に対する転写抑制因子として作用していることが示唆されたため、siRNA を用いて KLF2 をノックダウンした際の CXCR4 の発現変化を定量性 RT-PCR 法を用いて検索した。その結果、KLF2 siRNA 導入

により KLF2 mRNA が約 50% に抑制される条件下で (図 10 a)、CXCR4 mRNA の劇的な発現上昇が認められた (図 10 b)。以上より、KLF2 は CXCR4 に対し、強力な転写抑制因子として作用していることが示唆された。

考 察

ケモカインレセプターは、7 回膜貫通構造をもつ G 蛋白結合型受容体の 1 種であるが、その構造により、現在 4 つのファミリー (CC, CXC, CX3C, XC) に分類されている^{12, 14)}。これらファミリーに属するケモカインレセプターは、現在 18 種類がクローニングされているが、その発現は血球系細胞のみならず、上皮系・間葉系の細胞にも認められる。ケモカインシステムは生体防御や生体形成など、生体にとって有益なシステムと考えられてきた。しかしながら、1996 年ケモカインレセプターの 1 種である CXCR4 が human immunodeficiency virus-type 1 (以下 HIV と略) の細胞内エントリーの際に CD4 の共役レセプターになることが判明し²⁵⁾、2001 年、Müller らは乳癌の臓器特異的な転移が SDF-1/CXCR4 システムを利用しているという驚くべき報告をした²⁶⁾。こうして SDF-1/CXCR4 システムが生体に利害性を有する諸刃の剣であることが明らかにされ、その後も我々のグループを含め、多種多様な癌において SDF-1/CXCR4 システムと転移の関連性が報告された²⁷⁻³²⁾。そのため、現在までに CXCR4 を標的にした転移抑制療法の開発が様々なグループにより開発されている。その方法は CXCR4 に対する抗体療法²⁶⁾、合成阻害剤の使用^{21, 33)}、アンチセンスオリゴ³⁴⁾ の使用などが主であるが、

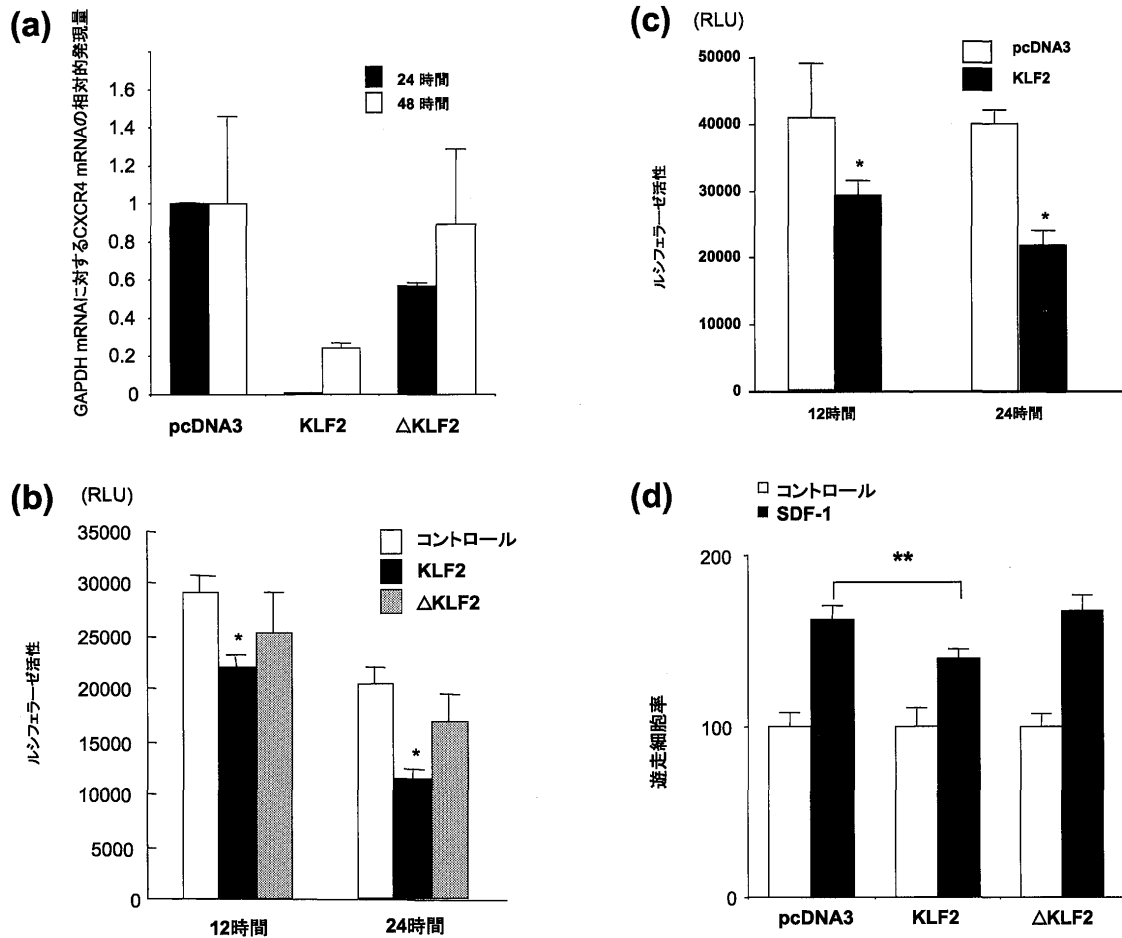


図9 KLF2 遺伝子導入による CXCR4の発現抑制

(a) KLF2 遺伝子導入による CXCR4 mRNA の発現を、導入後24時間と48時間でリアルタイム RT-PCR により検索した。KLF2 導入細胞では著しい CXCR4の発現低下が認められた。Δ KLF2は KLF2の DNA 結合領域を欠失させた発現ベクターを示す。(b, c) KLF2遺伝子と CXCR4プロモーター (-300/+86) ルシフェラーゼコンストラクトを共発現させた際の CXCR4プロモーター活性を検索した。その結果、KLF2 遺伝子を導入した B88 細胞 (b), COS-7 細胞 (c) では CXCR4 のプロモーター活性の有意な低下が認められた (*, $P<0.05$)。 (d) KLF2 遺伝子導入による SDF-1 反応性の細胞遊走能の変化を検索した。KLF2 導入細胞において、SDF-1 反応性の細胞遊走が有意に低下していた (**, $P<0.05$)。全ての実験は2回繰り返して行い、同様の結果を得た。

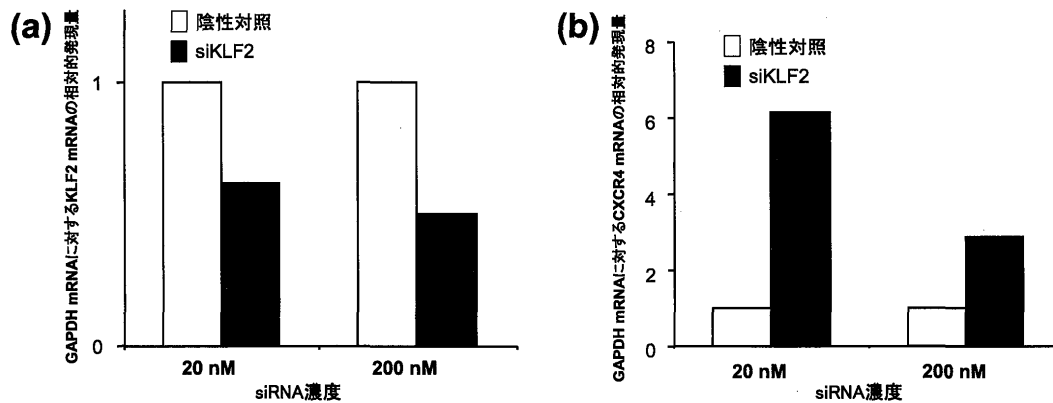


図10 KLF2 siRNA による CXCR4 の発現変化

KLF2 siRNA を用いて KLF2 をノックダウンした際の、KLF2 (a) と CXCR4 (b) の発現変化をリアルタイム RT-PCR にて検索した。(a) KLF2 siRNA 導入により KLF2 mRNA の発現は約50%程度に抑制された。(b) (a) の条件下で CXCR4 mRNA の発現は劇的に上昇していた。実験は2回繰り返して行い、同様の結果を得た。

現在のところ、どの治療法が最も効果的であるかという結論は出ていない。そこで、本研究では、我々の研究室で確立された同所性移植モデルを用いて、まず siRNA を用いた人工的な CXCR4 の発現抑制によるリンパ節転移抑制効果を確認した上で、CXCR4 阻害剤、キナーゼ阻害剤、CXCR4 発現抑制効果を有する抗癌剤の3つの方法を試みることににより CXCR4 抑制法を至適化することを目的とした。

RNA 干渉法は、現在では遺伝子の機能解析においてのみならず、核酸医薬品としての臨床応用の可能性も含め、強力なツールとして着目されている。siRNA を用いた実験系で問題にされているのは、siRNA を直接細胞に導入した場合、導入された siRNA の効果が、導入後最大でも1週間程度といわれており、長期的実験には不向きなことであった。そこで、長期的実験が可能なシステムとして、リボザイムの発現系として用いられてきた U6 プロモーターによる Pol III 転写系を利用することにより、細胞内で siRNA を産生する siRNA 発現ベクターが開発された³⁵⁾。本研究においても、ケモカインレセプター CXCR4 の発現抑制による *in vivo* におけるリンパ節転移抑制効果を、少なくとも28日間検索する必要があったため、siRNA ベクターを利用し、CXCR4 ノックダウン細胞を樹立した。siRNA 発現システムにはヘアピンタイプとタンデムタイプがあり、導入する濃度が高濃度であれば差異はないが、低濃度ではヘアピンタイプがより高い抑制効果を認めるという報告がある³⁶⁾。そのため、本研究ではヘアピンタイプの siRNA 発現ベクターを使用した。B88 における CXCR4 の発現抑制は50%程度であった。この抑制効率は決して高いとは言えないが、本ベクターの供与先である Taichman らの報告と同程度の抑制効率を認めていることから¹⁸⁾、より抑制効率を上昇させるためには、実験条件の変更よりも、本ベクターに挿入された siRNA 配列を変更する必要があると考えられる。しかしながら、樹立されたノックダウン細胞においては機能的に SDF-1/CXCR4 システムが抑制されていたことから、SDF-1/CXCR4 の作用発現には CXCR4 の高レベルの発現が重要であることが示唆された。本研究において、CXCR4 のノックダウンは B88 細胞におけるリンパ節転移を著明に抑制したが、同時に原発巣の腫瘍サイズも有意に減少させた。今回の研究において、*in vitro* における2次元培養では SDF-1 の添加に関わらず、B88-siCXCR4 細胞とコントロール細胞の増殖に顕著な差は認められなかったため（データには示していない）、この理由は不明である。しかしながら、近年、SDF-1/CXCR4 システムが腫瘍の外方性増殖に重要であることも示唆されており^{37, 38)}、*in vivo* における結果は3次元培養における細胞増殖活性の差が原因であることも考えられるため、今後詳細な解析が必要である。一方、CXCR4 ノックダウン細胞移植マウスにおいては、マウスの体重減少抑制効果が認められ、癌悪液質病態を

緩和していた。癌悪液質病態には、従来 interleukin（以下 IL と略）-1, IL-6, IL-8, IL-11, tumor necrosis factor-alpha（以下 TNF- α と略）等の各種サイトカインの産生が関連していると考えられている^{39, 40)}。本研究における体重減少の抑制は、上述の腫瘍サイズの違いによる摂食障害の差異に由来するとも考えられるが、SDF-1/CXCR4 システムは IL-6 や IL-8⁴¹⁾、TNF- α ⁴²⁾ の産生を増強させることが報告されており、CXCR4 ノックダウン細胞移植マウスにおいて、腫瘍由来のサイトカイン産生が抑制され、癌悪液質を抑制したとも考えられる。

上述のごとく、CXCR4 は T 細胞性 HIV 感染時のレセプターとして関与する事が知られている²⁵⁾。HIV は T 細胞に感染する際、T 細胞表面に存在する CD4 にグリコプロテインである gp120 を介し結合する。その後、gp120 が T 細胞上の CXCR4 と結合すると、gp41 が T 細胞表面のアンカーとなり、HIV は感染できると言われている²¹⁾。そのため、種々の CXCR4 阻害剤が HIV 治療薬として開発されているが⁴³⁾、多くは gp120 と CXCR4 の結合を阻害するものである。CXCR4 阻害性合成バイサイクリン構造を有する AMD3100²¹⁾、カプトガニ血清由来抗菌抗ウイルスペプチドである T22⁴⁴⁾ や T140⁴⁵⁾、T140 derivative である TC14012⁴⁶⁾ や TN14003⁴⁶⁾、低分子 CXCR4 アンタゴニストである FC131⁴⁷⁾ が代表的な CXCR4 阻害剤であるが、今回我々はそれら阻害剤の中で現在最も臨床応用が期待されており、安定した CXCR4 阻害効果を認めている AMD3100 に着目した。CXCR4 阻害剤である AMD3100 はバイサイクリン構造を有しており、CXCR4 レセプターにおけるアスパラギン酸に結合することによって、SDF-1 の結合や HIV の細胞内エントリーを阻害する事が知られている²¹⁾。また、HIV 治療以外にも CD34 陽性造血性幹細胞の動員する際の治療薬として臨床試験が行われている^{48, 49)}。本研究において、ヌードマウス同所性移植モデルにおける AMD3100 のリンパ節転移抑制効果を検討したところ、摘出リンパ節の個数、重量、ルシフェラーゼ活性において、コントロール群に比較し有意な抑制効果が認められた。本実験においては、病理組織学的な解析は行っていないため、摘出したリンパ節が全て転移リンパ節であるとは断定できないが、AMD3100 処理群の摘出リンパ節において、重量とルシフェラーゼ活性が減少していたことから、転移癌細胞数が定量的に減少していると考えられる。一方、前述の CXCR4 siRNA 実験の結果と比較すると、AMD3100 は原発巣のサイズ、体重に影響を与えなかった。この理由は不明であるが、Rubin らによる皮下投与の実験系では、AMD3100 は半減期が短いことから1日2回投与を行っていたが⁵⁰⁾、本研究ではプロトコルを改変し、1日1度の投与で投与量を倍増した。その結果、siRNA 実験とは異なり、AMD3100 の半減期により持続的に CXCR4 シグナルを阻害できなかったとも考えられる。今後、投与回数や至適濃度を調整するこ

とで、より効率的に AMD3100 を使用できることが考えられるが、本研究結果からは、AMD3100 は優れたリンパ節転移抑制作用を有するが、*in vitro*, *in vivo* において細胞増殖抑制作用に乏しいことが示唆された。

既に我々は SDF-1/CXCR4 シグナルが ERK1/2 および Akt/PKB シグナル伝達経路を活性化することを見出している¹²⁾。また、その他のレセプターリガンドシステムを使用したリンパ節転移時に活性化されるシグナル伝達経路が、ERK1/2 や Akt/PKB であることも示唆されている^{51, 52)}。さらに、癌細胞における一般的な増殖シグナルは、チロシンキナーゼ受容体から PI3K-Akt を介する経路や ras-ERK1/2 を介する経路であることが明らかにされていることから^{22, 23)}、これら経路に対するキナーゼ阻害薬を用いることで、細胞増殖、浸潤、転移を効率的に抑制できると考えられる。本研究で使用した U0126, MEK1/2 に対する強力かつ特異的な阻害剤であり、この阻害効果は MEK 基質や ATP および ERK に関して非競合的であり、他のキナーゼにはほとんど影響を与えない優れたキナーゼ阻害剤である⁵³⁾。一方、wortmannin は、アオカビの 1 種である *Penicillium wortmanni* の産生物質であり、以前から抗菌活性、抗炎症活性など、様々な生理活性を持つ天然物として知られていたが、近年、強力かつ特異的な PI3K 阻害活性を有することが見出された⁵⁴⁾。これらキナーゼ阻害剤を用いて、ヌードマウス咬筋内同所性移植モデルにおけるリンパ節転移抑制効果を検索したところ、キナーゼ阻害剤投与により有意なリンパ節転移抑制効果を認めたが、grade 3 (20%以上の体重減少)の著しい体重減少が認められた。上述の CXCR4 シグナルの単独阻害では体重減少は認められなかったことより、この副作用はキナーゼ阻害剤による SDF-1/CXCR4 シグナル非依存的効果に由来するものと考えられ、MEK-ERK1/2 および、PI3K-Akt pathway は、生体にとって重要な生存シグナルであることが示唆された。既に wortmannin は臨床応用が困難であることが明らかにされており⁵⁵⁾、キナーゼ阻害剤は投与量や投与経路を検討しても、臨床応用が困難であると考えられた。

投与法の確立された増殖抑制作用を有する既存の抗癌剤において、CXCR4 の発現抑制作用を有する薬剤の検索を行ったところ、ベスナリノン処理細胞においてのみ CXCR4 の発現低下が認められた。ベスナリノンは 2,1H キノリノン系を基本骨格とする誘導体でジキタリスに変わる慢性心不全の経口治療薬として開発、認可されるも無顆粒球症発症が問題となり、現在使用は制限されている^{56, 57)}。しかしながら、その後の研究にて *in vitro* および *in vivo* において多くの腫瘍細胞に対して分化・アポトーシス誘導活性^{58, 59)}、細胞増殖抑制活性などの抗癌作用を有すること^{60, 61)}、臨床において放射線・化学療法の効果を上昇させること⁶²⁻⁶⁴⁾などが明らかにされた。我々の研究室では、これら一連の過程における分子メカニズムとして、ベスナリノンによる p21^{waf1}⁶⁵⁾ や transforming

growth factor β -stimulated clone (tsc)-22⁶⁶⁾ の発現誘導が重要であることを明らかにしている。一方、抗転移作用に関しては、臨床においてベスナリノンと gemcitabine の併用療法により、乳癌患者におけるリンパ節・肝臓・骨転移や、肺癌患者における脳・リンパ節転移を抑制したとの報告があるのみであり⁶⁴⁾、ベスナリノンが実際に抗転移作用を有するかどうか、さらにはその際の分子メカニズムに関しては明らかではなかった。本研究における実験的治療では、過去の我々の研究室における実験結果にて、200 mg/kg のベスナリノン投与により、ヌードマウス背部皮下に移植されたヒト唾液腺癌細胞の増殖抑制作用を認めたことから⁶¹⁾、抗転移作用のみを期待し低濃度 (50 mg/kg) のベスナリノンを使用した。その結果、ベスナリノン投与群では抗腫瘍効果は認められなかったが、コントロール群と比較して摘出リンパ節の重量、ルシフェラーゼ活性が有意に低下していたことより、ベスナリノンは抗転移作用を有することが明らかとなった。

現在まで、CXCR4 の発現上昇は c-Myc⁶⁷⁾、NF- κ B⁶⁸⁾、hypoxia inducible factor (以下 HIF と略)⁶⁹⁾ により、発現減少は Yin-Yang 1⁶⁷⁾ などの転写因子により制御されることが明らかにされている。また、granulocyte colony-stimulating factor⁷⁰⁾、interferon- γ ⁷¹⁾、TNF- α ⁷²⁾ などのサイトカインシグナルも CXCR4 の発現に影響を与えることが報告されている。本研究で同定した、転写開始地点より -300 から -167 までの 134 bp 内に存在するベスナリノン反応性領域には、E-box タンパク、NF- κ B、NFAT、KLF など様々な転写因子結合領域が存在していたが、上述の CXCR4 調節因子の中で、この領域内に結合しうる転写因子として NF- κ B が挙げられる。さらに、ベスナリノンが TNF- α 誘導性の NF- κ B 活性を抑制するとの報告⁷³⁾も存在したことから、当初 NF- κ B がベスナリノンによる CXCR4 調節因子であると予想された。しかしながら、この領域内に結合しうる転写因子を cDNA マイクロアレイ法により検索した結果、ベスナリノン反応性領域に結合しうる転写因子は、現在までに CXCR4 との関連は論じられていない KLF2 のみであった。KLF2 は zinc フィンガーファミリーに属する転写調節因子で、脾臓、肺において過剰に発現していたことから、lung KLF (LKLF) とも呼ばれる⁷⁴⁾。最近の報告では c-myc の発現抑制を介して T 細胞の増殖を抑制すること⁷⁵⁾、PPAR- γ の発現抑制により脂肪分化を負に制御すること⁷⁶⁾、血管内皮細胞の増殖を NF- κ B 活性を負に制御することにより抑制すること⁷⁷⁾、胸腺細胞や T 細胞の遊走に必須であること⁷⁸⁾が明らかにされている。KLF2 は KLF1 および KLF4 と同一のファミリーに属し、N 末の酸性活性化領域、zinc フィンガーに隣接した抑制領域、核移行シグナルよりなり⁷⁹⁾、過去の報告では転写活性作用と転写抑制作用を有することが報告されている⁷⁹⁾。しかしながら、上述の報告を総合すれば、KLF2 は一般的に転写抑制因子と考えた方が良さそうである。実際、本研究において

も、ベスナリノン処理により KLF2 mRNA の発現は経時的に上昇しており、KLF2 の強制発現は CXCR4 の発現を著しく低下させた。ベスナリノン反応性領域に存在する KLF の結合領域である CACCC 配列は⁷⁹⁾、現在同定されている数多くの KLF ファミリーにより認識されることが考えられるが、マイクロアレイによる13種の KLF ファミリーの検索では、ベスナリノンにより発現誘導が認められる KLF は KLF2 のみであった。ベスナリノンが数多くの KLF ファミリーの中で KLF2 のみを発現誘導する理由は不明であるが、今後 KLF2 プロモーターを使用し、KLF2 プロモーター内のベスナリノン反応性領域を同定することが重要であると思われる。本研究の結果より、ベスナリノンが KLF2 の発現上昇を介して、CXCR4 を発現抑制し、優れたリンパ節転移抑制作用を発揮することが示唆されたが、ベスナリノンは前述の無顆粒球症発症のリスクを有することより、臨床応用は慎重に行う必要があると考えられる。

本研究において種々の CXCR4 阻害剤による実験を行った結果、いずれの実験系においてもリンパ節転移抑制効果が認められたが、体重減少等の副作用が少ないものは siRNA や AMD3100 など、CXCR4 を特異的に阻害する実験系であった。本研究結果は、CXCR4 が口腔扁平上皮癌のリンパ節転移抑制療法分子標的になりうる可能性を強く示唆するものである。しかしながら、原発腫瘍に対する増殖抑制効果も含め、効果的に癌治療を行うためには、AMD3100 やベスナリノンなどの CXCR4 阻害剤の単独投与は困難であることが予想される。今後、AMD3100 やベスナリノンを従来の放射線化学療法と組合せるなど、抗リンパ節転移療法に対する適切なプロトコルの確立が重要になるとと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ御指導を賜った徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス部口腔腫瘍制御学分野 佐藤光信名誉教授、吉田秀夫助教授に深甚なる謝意を表しますと共に、御校閲、御助言を戴いた口腔顎顔面外科学分野 長山 勝教授、口腔分子病態学分野 林 良夫教授、分子薬理学分野 吉本勝彦教授に深謝いたします。また本研究の実施に際し終始御指導を戴いた口腔腫瘍制御学分野 内田大亮博士、ならびに研究の円滑な進展のために特別のご配慮を戴いた口腔腫瘍制御学分野の教室の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94, 153-156 (2001)
- 2) Hunter KD, Parkinson EK and Harrison PR: Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 127-35 (2005)
- 3) Kimura K, Suga S, Shimaji T, Kitamura M, Kubo K, Suzuoki Y and Isobe K: Clinical basis of chemotherapy for gastric cancer with uracil and 1-(2'-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil. *Gastroenterol Jpn* 15, 324-329 (1980)
- 4) Shirasaka T, Nakano K, Takechi T, Satake H, Uchida J, Fujioka A, Saito H, Okabe H, Oyama K, Takeda S, Unemi N and Fukushima M: Antitumor activity of 1 M tegafur-0.4 M 5-chloro-2,4-dihydropyridine-1 M potassium oxonate (S-1) against human colon carcinoma orthotopically implanted into nude rats. *Cancer Res* 56, 2602-2606 (1996)
- 5) Pisani P, Parkin DM, Bray F and Ferlay J: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83,18-29 (1999)
- 6) Parkin DM, Pisani P and Ferlay J: Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80, 827-841 (1999)
- 7) Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK and Myers JN: Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* 97, 1464-1470 (2003)
- 8) Hemmer J and Kreidler J: Flow cytometric DNA ploidy analysis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. Comparison with clinical staging and histologic grading. *Cancer* 66, 317-320 (1990)
- 9) Ono I, Ebihara S, Saito H and Yoshizumi T: Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the head and neck. *Auris Nasus Larynx* 12 Suppl 2, S85-S89 (1985)
- 10) Kalnins IK, Leonard AG, Sako K, Razack MS and Shedd DP: Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the oral cavity. *Am J Surg* 134, 450-454 (1977)
- 11) Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Harada K, Yoshida H and Sato M: Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines. *Int J Cancer* 70, 120-127 (1997)
- 12) Uchida D, Begum NM, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y, Hamakawa H, Yoshida H and Sato M: Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 290, 289-302 (2003)
- 13) Rossi D and Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242 (2000)
- 14) Zlotnik A and Yoshie O: Chemokine a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127 (2000)

- 15) Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Bando T, Almofti A, Yoshida H and Sato M: Acquisition of lymph node, but not distant metastatic potentials, by the over-expression of CXCR4 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Lab Invest* 84, 1538-1546 (2004)
- 16) Ammar A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H and Sato M: The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 25, 65-71 (2004)
- 17) Timmons L, Tabara H, Mello CC and Fire AZ: Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14, 2972-2983 (2003)
- 18) Wang J, Wang J, Sun Y, Song W, Nor JE, Wang CY and Taichman RS: Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. *Cell Signal* 17, 1578-1592 (2005)
- 19) Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ and Krek W: Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307-311 (2003)
- 20) Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denking DJ, Kawahara R, Hauner H and Jain MK: The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression and adipogenesis. *J Biol Chem* 278, 2581-2584 (2003)
- 21) De Clercq E: The bicyclam AMD3100 story. *Nat Rev Drug Discov* 2, 581-2587 (2003)
- 22) Schlessinger J: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225 (2000)
- 23) Blume-Jensen P and Hunter T: Oncogenic kinase signaling. *Nature* 411, 355-365 (2001)
- 24) Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Uchida D, Hino S and Fujimori T: Vesnarinone: a differentiation-inducing anti-cancer drug. *Anticancer Drugs* 14, 391-395 (2003)
- 25) Feng Y, Broder CC, Kennedy PE and Berger EA: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877 (1996)
- 26) Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E and Zlotnik A: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56 (2001)
- 27) Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G and Balkwill FR: Epithelial cancer cell migration, a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61, 4961-4965 (2001)
- 28) Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS and McCauley LK: Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 62, 1832-1837 (2002)
- 29) Schrader AJ, Lechner O, Templin M, Dittmar KE, Machtens S, Mengel M, Probst-Keppler M, Franzke A, Wollensak T, Gatzlaff P, Atzpodien J, Buer J and Lauber J: CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer* 86, 1250-1256 (2002)
- 30) Zhou Y, Larsen PH, Hao C and Yong VW: CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem* 277, 49481-49487 (2002)
- 31) Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, Sattler M, Johnson BE and Salgia R: Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 62, 6304-6311 (2002)
- 32) Hwang JH, Hwang JH, Chung HK, Kim DW, Hwang ES, Suh JM, Kim H, You KH, Kwon OY, Ro HK, Jo DY and Shong M: CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 408-416 (2003)
- 33) Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, Nie S, Umbreit J and Shim H: Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 64, 4302-4308 (2004)
- 34) Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L and Shim H: Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 65, 967-971 (2005)
- 35) Miyagishi M and Taira K: U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 20, 497-500 (2002)
- 36) Miyagishi M and Taira K: Strategies for generation of an siRNA expression library directed against the human genome. *Oligonucleotides* 13, 325-333 (2003)
- 37) Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnicka-Worms D and Luker GD: CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 64, 8604-8612 (2004)
- 38) Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L and Roos E: The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 63, 3833-3839 (2003)
- 39) Kurzrock R: The role cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer* 92, 1684-1688 (2001)
- 40) Pfizenmaier J, Vessella R, Higano CS, Noteboom JL, Wallace D Jr and Corey E: Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma. *Cancer* 97, 1211-1216 (2003)
- 41) Nanki T, Nagasaka K, Hayashida K, Saita Y and

- Miyasaka N: Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167, 5381-5385 (2001)
- 42) Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, Bridger G and Balkwill FR: Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 62, 5930-5938 (2002)
 - 43) Tsutsumi H, Tanaka T, Ohashi N, Masuno H, Tmamura H, Hiramatsu K, Araki T, Ueda S, Oishi S and Fujii N: The therapeutic potential of the chemokine receptor CXCR4 antagonists as multi-functional agents. *Biopolymers* (2006) Epub ahead of print
 - 44) Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tmamura H, Yoshida N, Waki M, Matsumoto A, Yoshie O, Kishimoto T, Yamamoto N and Nagasawa T: A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV infection. *J Exp Med* 20, 1389-1393 (1997)
 - 45) Tamamura H, Xu Y, Hattori T, Zhang X, Arakaki R, Kanbara K, Omagari A, Otaka A, Ibuka T, Yamamoto N, Nakashima H and Fujii N: A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 877-882 (1998)
 - 46) Tamamura H, Omagari A, Hiramatsu K, Gotoh K, Kanamoto T, Xu Y, Kodama E, Matsuoka M, Hattori T, Yamamoto N, Nakashima H, Otaka A and Fujii N: Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 1897-1902 (2001)
 - 47) Fujii N, Oishi S, Hiramatsu K, Araki T, Ueda S, Tamamura H, Otaka A, Kusano S, Terakubo S, Nakashima H, Broach JA, Trent JO, Wang Z and Peiper SC: Molecular-size reduction of a potent CXCR4-chemokine antagonist using orthogonal combination of conformation- and sequence-based libraries. *Angew Chem Int Ed* 42, 3251-3253 (2003)
 - 48) Liles WC, Rodger E, Broxmeyer HE, Dehner C, Badel K, Carandra G, Christensen J, Wood B, Price TH and Dale DC: Augmented mobilization and collection of CD34⁺ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion* 45, 295-300 (2005)
 - 49) De Clercq E: Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem* 5, 805-824 (2005)
 - 50) Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, Schmidt K, Kieran MW, Luster AD and Segal RA: A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13513-13518 (2003)
 - 51) Albanell J, Codony-Sevat J, Rojo F, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, Raspall G, Giralt J, Rosello J, Nicholson RI, Mendelsohn J and Baselga J: Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 61, 6500-6510 (2001)
 - 52) Tang Y, Zhang D, Fallavollita L and Brodt P: Vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis are regulated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res* 63, 1166-1171 (2003)
 - 53) Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feese WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA and Trzaskos JM: Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273, 18623-18632 (1998)
 - 54) Powis G, Bonjouklian R, Berggern MM, Gallegos A, Abramam R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J and Grindey G: Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 54, 2419-2423 (1994)
 - 55) 藤田直也, 佐藤沙織, 鶴尾隆: 生存シグナルを標的とした創薬. *現代医療* 35, 2845-2850 (2003)
 - 56) Asanoi H, Sasayama S, Iuchi K and Kameyama T: Acute hemodynamic effects of a new inotropic agent (OPC-8212) in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 9: 865-871 (1987)
 - 57) Cohn JN, Goldstein SO, Greenberg BH, Lorell BH, Bourge RC, Jaski BE, Gottlieb SO, McGrew F 3rd, DeMets DL and White BG: A dose-dependent increase in mortality with vesnarinone among patients with severe heart failure. Vesnarinone Trial Investigators. *N Engl J Med* 339, 1810-1816 (1998)
 - 58) Sato S, Tomoyasu S, Okabe-Kado J, Hozumi M, Tsuruoka N, Nakai S, Adachi M and Honma Y: Induction of differentiation and enhancement of vincristine sensitivity of human erythroleukemia HEL cells by vesnarinone, a positive inotropic agent. *Exp Hematol* 24, 37-42 (1996)
 - 59) Isaka K, Fujito A, Sagawa Y, Yudate T, Nishi H, Ito H and Takayama M: Induction of apoptosis in human choriocarcinoma cell lines by treatment with 3,4-dihydro-6-[4-(3,4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1H)-quinolinone (vesnarinone). *Oncol Rep* 9, 1299-1305 (2002)

- 60) Khalaf W, Maina C, Byers J and Harvey W: Interferon-alpha 2 β and vesnarinone influence levels of tumor necrosis factor-alpha, apoptosis, or interleukin 6 in ESKOL, a hairy cell leukemic cell line. A potential cytokine and oncogene relationship regulating apoptosis is suggested. *Leuk Res* 26, 169-177 (2002)
- 61) Sato M, Harada K, Bando T, Shirakami T, Nakashiro K, Yoshida H, Nakai S, Kawai K and Adachi M: Characteristics of antitumor activity of 3,4-dihydro-6-[4-(3,4-dimethoxybenzoyl)-1-piperazinyl]-2(1H)-quinolinone (vesnarinone) against a human adenoid squamous carcinoma-forming cell line grown in athymic nude mice. *Cancer Lett* 91, 1-9 (1995)
- 62) Sato M, Harada K, Yura Y, Bando T, Azuma M, Kawamata H, Iga H and Yoshida H: Induction of tumour differentiation and apoptosis and LeY antigen expression in treatment with differentiation-inducing agent, vesnarinone, of a patient with salivary adenoid cystic carcinoma. *Apoptosis* 2, 106-113 (1997)
- 63) Sato M, Harada K, Yura Y, Bando T, Azuma M, Kawamata H, Iga H, Tsujimoto H, Yoshida H and Adachi M: The treatment with differentiation- and apoptosis-inducing agent, vesnarinone, of a patient with oral squamous cell carcinoma. *Apoptosis* 2, 313-318 (1997)
- 64) Patnaik A, Rowinsky EK, Tammara BK, Hidalgo M, Drengler RL, Garne AM, Siu LL, Hammond LA, Felton SA, Mallikaarjun S, Von Hoff DD and Eckhardt SG: Phase I and pharmacokinetic study of the differentiating agent vesnarinone in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 18, 3974-3985 (2000)
- 65) Omotehara F, Kawamata H, Uchida D, Hino S, Nakashiro K and Fujimori T: Vesnarinone, a differentiation inducing drug, directly activates p21(waf1) gene promoter via Sp1 sites in a human salivary gland cancer cell line. *Br J Cancer* 87, 1042-1046 (2002)
- 66) Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Hino S, Omotehara F, Yoshida H and Sato M: Induction of TSC-22 by treatment with a new anti-cancer drug, vesnarinone, in a human salivary gland cancer cell. *Br J Cancer* 77, 71-78 (1998)
- 67) Moriuchi M, Moriuchi H, Margolis DM and Fauci AS: USF/c-Myc enhances, while Yin-Yang 1 suppresses, the promoter activity of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol* 162, 5986-5992 (1999)
- 68) Helbig G, Christopherson KW 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE and Nakshatri H: NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 278, 21631-21638 (2003)
- 69) Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ and Krek W: Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425, 307-311 (2003)
- 70) Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahv M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Sipore D and Lapidot T: G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3, 687-694 (2002)
- 71) Katayama A, Ogino T, Bando N, Nonaka S and Harabuchi Y: Expression of CXCR4 and its down-regulation by IFN- γ in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 11, 2937-2946 (2005)
- 72) Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek PW, Balkwill FR and Wilson JL: The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res* 65, 10355-10362 (2005)
- 73) Manna SK and Aggarwal BB: Vesnarinone suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun kinase, and apoptosis. *J Immunol* 164, 5815-5825 (2000)
- 74) Anderson KP, Kern CB, Crable SC and Lingrel JB: Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol Cell Biol* 15, 5957-5965 (1995)
- 75) Buckley AF, Kuo CT and Leiden JM: Transcription factor LKLF is sufficient to program T cell quiescence via a c-Myc-dependent pathway. *Nature Immunol* 2, 698-704 (2001)
- 76) Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denking DJ, Kawahara R, Hauner H and Jain MK: The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem* 278, 2581-2583 (2003)
- 77) SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, Chen Z, Simon DI, Luscinskas FW, Michel TM, Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G and Jain MK: KLF2 is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med* 199, 1305-1315 (2004)
- 78) Carlson CM, Endrizzi BT, Wu J, Ding X, Weinreich MA, Walsh ER, Wani MA, Lingrel JB, Hogquist KA and Jameson SC: Kruppel-like factor 2 regulates thymocyte and T-cell migration. *Nature* 442, 299-302 (2006)
- 79) Lomberg G and Urrutia R: The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins. *Biochem J* 392, 1-11 (2005)